Nachweis Retrovirus-ähnlicher Partikel in humanen Teratocarcinomzellinien

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität

Tübingen

vorgelegt von

Roswitha Löwer
aus Oldenburg/Oldb.

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0058

Nachweis Retrovirus-ähnlicher Partikel in humanen Teratocarcinomzellinien

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität

Tübingen

vorgelegt von

Roswitha Löwer
aus Oldenburg/Oldb.

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 8. 12. 1983

Dekan	:	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. R. Kurth
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. W. Seyffert

Die vorliegende Arbeit wurde am Friedrich Miescher Laboratorium der Max Planck Gesellschaft, Tübingen, ausgeführt und von der Max Planck Gesellschaft durch ein Promotionsstipendium gefördert.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Kurth für das interessante Thema, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die rege Anteilnahme an den auftauchenden Problemen. Ihm sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gilt auch mein Dank für die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen anregenden Diskussionen.

Herrn Dr. H. Frank, dem Leiter der elektronenmikroskopischen Abteilung am Max Planck Institut für Virusforschung, der mich in die Technik der Elektronenmikroskopie einführte, bin ich besonders zu Dank verpflichtet. Ohne die Hilfe der Mitarbeiter seiner Abteilung - Frau Kleih übernahm die Einbettung der Präparate, Frau Zimmermann die Herstellung der Ultradünnschnitte, Frau Grömpke war für die Photoabteilung verantwortlich - wäre es nicht möglich gewesen, die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in diesem Umfang durchzuführen.

Studentische Hilfskräfte unterstützten mich bei der elektronenmikroskopischen Auswertung einiger Versuchsreihen. Hier möchte ich vor allem Fräulein J. Hentschel meinen Dank aussprechen für ihre engagierte, selbständige Mitarbeit.

Ich danke auch dem Präsidenten des Paul Ehrlich Institutes, Frankfurt, Herrn Prof. Dr. H.-D. Brede, der mir einen Arbeitsplatz zur Auswertung und Niederschrift meiner Experimente zur Verfügung stellte.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, bei meinem Mann und meinen Kindern für das Verständnis, das sie meiner wissenschaftlichen Tätigkeit entgegenbrachten, besonders aber bei meiner Mutter, die mir immer wieder durch Entlastung im häuslichen Bereich ein ruhiges, zügiges Arbeiten ermöglichte.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

			Seite
EINLEITUNG			1
ERGEBNISSE			9
I		Teratocarcinome in Zellkultur	9
	A.	Etablierung der Tübinger Teratocarcinomlinien	9
	B.	Morphologieänderung durch veränderte Kulturbedingungen	13
II		Teratocarcinomzellen produzieren C-Typ ähnliche Partikel	16
	A.	Nachweis im Elektronenmikroskop	16
	B.	C-Typ Morphologie der Partikel	21
III		Nachweis einer RNS abhängigen DNS Polymerase	24
	A.	Partikelreinigung	24
	B.	Nachweis einer Enzymaktivität mit synthetischen Template-Primern	25
	C.	Nachweis einer RNS abhängigen DNS Polymerase durch die endogene Reaktion	30
IV		Test auf Infektiosität der HTD-Partikel durch Kokultivierungsexperimente	33
V		Überinfektionen mit dem endogenen Pavianvirus BEV	37
VI		Charakterisierung der Teratocarcinomzellen	40
	A.	Frage nach dem Differenzierungspotential der Zellen	40
	B.	Ultrastruktur der Teratocarcinomzellen	45
	C.	Teratocarcinomzellen produzieren Humanes Chorion Gonadotropin, ein Hormon der Plazenta	51
DISKUSSION			55
MATERIAL UND METHODEN			62
ZUSAMMENFASSUNG			70
LITERATURVERZEICHNIS			72

E I N L E I T U N G

1. Entdeckung der RNS Tumorviren (Retroviren)

Bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts waren Versuche, Leukämien und Sarkome bei Hühnern durch zellfreie Agenzien zu übertragen, erfolgreich (Ellermann und Bang, 1908 ; Rous, 1911). Wesentliche Fortschritte bei der Identifizierung der entsprechenden Erreger wurden jedoch erst ab Mitte der fünfziger Jahre erzielt: Gaylord (1955) sowie Bernhard et al. (1956) untersuchten die Morphologie der Viruspartikel im Elektronenmikroskop, Crawford und Crawford zeigten 1961, daß das genetische Material der Viren aus RNS besteht, Temin und Mizutani sowie Baltimore entdeckten 1970 die RNS abhängige DNS Polymerase, das charakteristische Enzym der Viren.

Obwohl die Beteiligung von RNS-haltigen Viren an der Entstehung von Tumoren bei einer Vielzahl von Tierspezies nachgewiesen werden konnte (Maus, Katze, Rind, Affe, etc., Zusammenstellung bei Teich, 1982), war der intensiven Suche nach onkogenen RNS Viren des Menschen wenig Erfolg beschieden (Weiss, 1982). Erst 1980 konnte aus kultivierten Zellen eines T-Zell-Lymphoms ein Kandidat für ein transformierendes RNS Virus des Menschen isoliert werden, das Human-T-Cell Leukemia Virus, HTLV (Poiesz et al.).

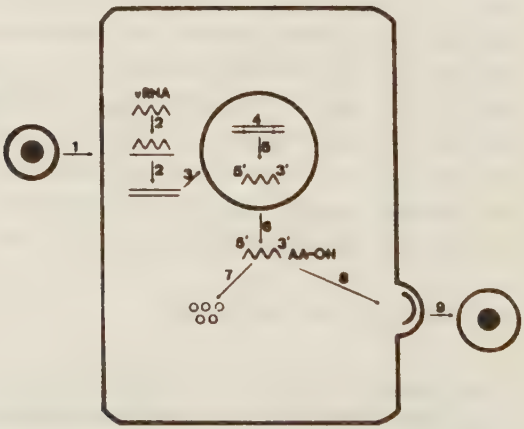
2. Taxonomie der Retroviren

Taxonomisch werden RNS Tumorviren der Familie der Retroviridae zugeordnet, die sich in drei Unterfamilien gliedert (Matthews, 1982, siehe dazu Bildtafel 11):

a) die Oncovirinae, zu denen neben den onkogenen Vertretern auch nicht transformierende Virusstämme und nicht infektiöse Partikel mit ähnlichen morphologischen, immunologischen und biochemischen Eigenschaften zählen;
b) die neuropathogenen Lentivirinae;
c) die bislang als apathogen geltenden Spumavirinae.

3. Replikationsmechanismus der Retroviren

Retroviren zeichnen sich durch einen besonderen Replikationsmechanismus aus, der auch Anlaß zur Namensgebung war. Nach der Absorption der Viruspartikel an spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und ihrer Penetration durch die Zellmembran, wird das genetische Material der Virionen im Cytoplasma freigesetzt. Diese Vorgänge sind im einzelnen noch weitgehend unerforscht (vergleiche Kapitel IV). Assoziiert mit den Nukleinsäuren ist die viruscodierte Polymerase, die in Umkehrung des zellulären Syntheseweges an der viralen RNS eine doppelsträngige DNS kopiert (Reverse Transcription). Über eine zirkuläre Zwischenform wird die DNS Kopie kovalent in die Wirtszell-DNS integriert, in der sie fortan wie ein zelleigenes Gen, als sogenanntes Provirus, mitrepliziert wird.



Figur 1: Replikationsmechanismus der Retroviren, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. R. Kurth, Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt.

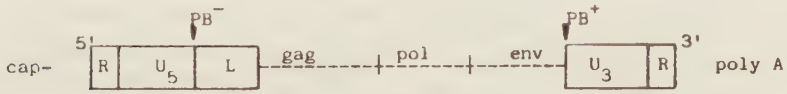
1 : Eindringen des Virus in die Wirtszelle, 2 : Reverse Transcription der viralen RNS (vRNA), 3 : Transport des Provirus in den Nukleus, 4 : Integration des Provirus in die zelluläre DNS, 5 : Transcription viraler RNS, 6 : Transport viraler RNS ins Cytoplasma, 7 : Translation der viralen Proteine, 8 : Knospungsprozeß, 9 : Reifung der Virionen.

Durch zelluläre Polymerasen wird an der Provirus-DNS eine RNS transcribiert, die einerseits als Messenger für die Synthese der Proteine dienen, andererseits als Genom in die Viruspartikel eingebaut werden kann. Unter Einbeziehen der Zellmembran in den Aufbau der Virushülle wird das Virion im sogenannten Knospungs- oder Buddingprozeß zusammengefügt und dabei aus der Zelle ausgeschleust, normalerweise ohne cytopathogen zu wirken (Abbildungen von Buddingstrukturen finden sich in Kapitel II). In Figur 1 ist der Replikationsmechanismus noch einmal schematisch verdeutlicht.

4. Genomstruktur der Retroviren

Das Genom der Retroviren, eine einzelsträngige RNS, ist, wie bereits angedeutet, in der Art einer Messenger RNS gebaut. Es besitzt eine cap Struktur am 5' - und eine Poly A Kette am 3' - Ende. Insgesamt umfaßt das Genom etwa 9 Kilobasen, was einem Molekulargewicht von rund 3 x 10^6 Dalton entspricht. In den Viruspartikeln sind zwei identische RNS Moleküle durch teilweise Basenpaarung verbunden. Diese dimeren RNS Moleküle sedimentieren im linearen Saccharosegradienten bei 60 bis 70 S, die monomeren Untereinheiten bei 30 bis 35 S.

Wie das folgende Schema zeigt, sind Retrovirusgenome relativ einfach gebaut:



R : : 20 bis 80 Nukleotide, identisch an beiden Enden des Genoms (terminale Redundanz),

U_5 : 80 bis 100 Nukleotide, zwischen R und PB^- ("unique" Sequenz am 5' Ende),

PB^- : Initiationsstelle für die Synthese des Minus-DNS-Strangs, Bindungsstelle für eine spezifische t-RNS, dem natürlichen Primer der Reversen Transcription,

L : etwa 250 Nukleotide, die PB^- von den Strukturgenen trennen ("leader" Sequenz),

gag: etwa 2 Kilobasen, codiert für die internen Strukturproteine, die vor allem den Innenkörper, das Viruscore aufbauen. Sie werden als hochmolekularer " precursor " translatiert und während der Partikelreifung in 4 bis 5 Proteine gespalten ("group specific antigens"),

pol: etwa 3 Kilobasen, codiert für die RNS abhängige DNS Polymerase (RDDP), auch Reverse Transcriptase (RT) genannt,

env: etwa 2 Kilobasen, codiert für 1 bis 2, meist glykosylierte Virushüllproteine, deren Synthese ebenfalls über Precursor-Moleküle abläuft ("envelope"). Sie werden beim Budding-Prozeß in die Elementarmembran der Zelle eingelagert und sind bei vielen Viren im Elektronenmikroskop als prominente Knöpfe oder "spikes" zu sehen,

PB^+: Initiationsstelle für die Synthese des Plus-DNS-Strangs,

U_3: 0,2 bis 1 Kilobase, enthält die Promotorsequenzen ("unique" Sequenz am 3' Ende).

Im Laufe der Reversen Transcription, deren Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, werden die Sequenzen U_3 und U_5 reziprok verdoppelt, so daß sich in den integrierten Proviren schließlich die Kombination U_3-R-U_5 an beiden Enden des Genoms befindet. Diese als LTR ("long terminal repeat") bezeichnete Region enthält die viralen Promotorsequenzen. Daher gehorchen Retroviren auch nach der Integration in das Wirtsgenom weitgehend ihren eigenen Regelmechanismen.

Ausführliche Darstellungen der Struktur von Retrovirusgenomen (Coffin), des Replikationsmechanismus (Varmus und Swanstrom) und des Viruszusammenbaus (Dickson et al.) finden sich in dem 1982 von R. Weiss et al. herausgegebenen Buch " RNA Tumor Viruses" (Cold Spring Harbor Laboratory, USA).

5. Morphologie der Retroviren

Im Elektronenmikroskop stellen sich Retroviren als sphärische Partikel mit einem Durchmesser von etwa 100 bis 120 nm dar. Die Oncovirinae werden nach morphologischen Kriterien in vier weitere Typen unterteilt: A, B, C (Bernhard, 1958) und D (Fine und Schochetman, 1978). Lentiviren und Spumaviren haben eine ähnliche Morphologie (Bildtafel 11).

Das folgende, 1978 von Frank et al. entworfene Modell soll den Aufbau der Retroviren an Hand eines C-Typ Partikels veranschaulichen.

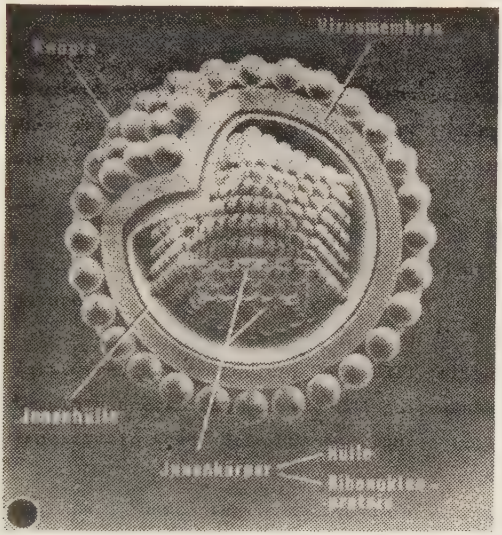


Bild 1: Modell der Retroviren, mit freundlicher Genehmigung von Dr. H. Frank, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

6. Transformierende Gene (Onkogene)

Akut transformierende Retroviren enthalten neben den bisher aufgeführten Genen ein weiteres Gen, das für Induktion und Aufrechterhaltung der Transformation einer Zelle verantwortlich ist. Am Beispiel des Rous Sarkom Virus des Huhnes konnte zuerst gezeigt werden, daß solche, als Onkogene bezeichneten Sequenzen nicht nur Teil eines Retrovirusgenoms sein können, sondern reguläre, normalerweise benigne Gene eukaryontischer Zellen darstellen, die durch Rekombinationsereignisse von den Retroviren aufgenommen worden sind (Stehelin et al., 1976). Mehr als 15 verschiedene Onkogene sind bis jetzt entdeckt worden mit ihren zellulären Homologen, den Protoonkogenen. Ihre starke Konservierung im Laufe der Evolution deutet darauf hin, daß die Genprodukte wichtige Zellfunktionen im Zellstoffwechsel und/oder bei Zellinteraktionen haben. Onkogene unterscheiden sich von ihren

Protoonkogenen allerdings dadurch, daß sie nicht in Introns und Exons gegliedert sind. Durch den Einbau der zellulären Sequenzen, dessen molekularer Mechanismus noch nicht endgültig geklärt ist (Bishop und Varmus, 1982), gehen in der Regel große Teile des viralen Genoms verloren. Es entstehen hoch onkogene Deletionsmutanten, deren Vermehrung nur in Gegenwart eines Helfervirus sichergestellt ist. Protoonkogene, die unter den Einfluß der aktiven viralen Promotoren gelangt sind, unterliegen nicht mehr ihren normalen zellulären Regelmechanismen. Ihre ständig erhöhte Expression kann, zumindest im Tierversuch, rasch zur Entstehung von Carcinomen führen (Vogt, 1983).

7. Endogene Retroviren

Nicht nur die Onkogene haben in den Protoonkogenen eine zelluläre Entsprechung, ganze Retrovirusgenome können als normale Bestandteile der Erbinformation aufgespürt werden. Hierbei handelt es sich um die sogenannten endogenen Viren. Im Gegensatz zu den exogenen, horizontal übertragbaren Retroviren werden endogene Retroviren über die Keimbahn übertragen und können durch Nukleinsäurehybridisierungstechniken in jeder Zelle ihres natürlichen Wirtes nachgewiesen werden. Ihre genetische Organisation entspricht im allgemeinen derjenigen von exogenen Retroviren. Sie werden wie autosomale Gene vererbt, zeigen allerdings eine erhebliche Instabilität: Mutationen, Deletionen, Variabilität in der Anzahl und der Verteilung von Proviren im Wirtsgenom (Coffin, 1982a).

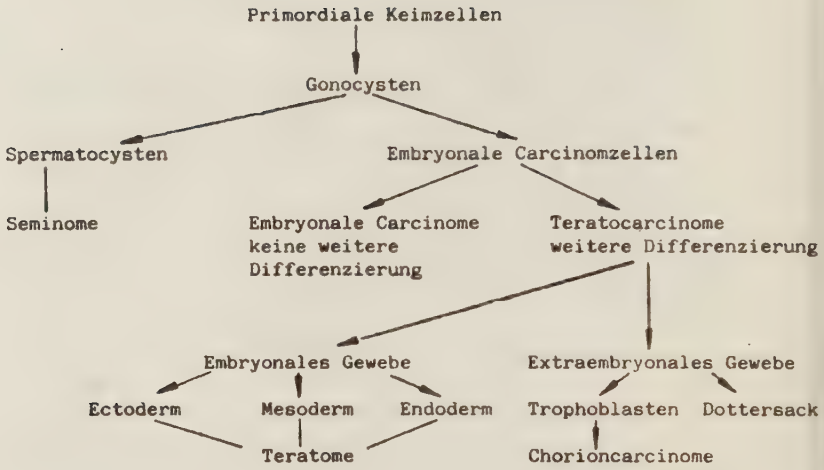
Endogene Viren werden selten exprimiert, doch finden sich alle Abstufungen von der Aktivierung einzelner Gene bis zur Synthese von infektiösen Partikeln. Für die Variabilität in der Expression sind neben Mutationen und Deletionen in den Provirusgenomen zelluläre Mechanismen wie Inhibition der Replikation oder Modifikation der DNS, z.B. durch Methylierung, denkbar. Expression endogener Viren in vivo konnte z.B. während der Embryonalentwicklung von Primaten entdeckt werden (Kalter et al. 1973). In vitro gelingt die Aktivierung unter anderem durch Behandlung von Zellkulturen mit ionisierenden Strahlen (Gross, 1958) oder mit Chemikalien (z.B. mit halogenierten Thymidinanalogen, Lowy et al. 1971).

Da endogene Retroviren in den letzten Jahren in immer mehr Tierspezies gefunden wurden, scheint ihre Vorkommen ubiquitär zu sein. Ihre biologische Bedeutung ist unbekannt. Unter natürlichen Bedingungen entwickeln sie offenbar kein onkogenes Potential. 1973 haben Kalter et al. zum ersten Mal Partikel mit Retrovirus ähnlicher Struktur in menschlichen Plazenten beschrieben, die jedoch bislang nicht näher charakterisiert werden konnten. Dieser Befund war seinerzeit ein wichtiger Hinweis auf die mögliche Existenz endogener Oncoviren des Menschen.

8. Suche nach humanen Retroviren

Als erfolgversprechende Methoden bei der Suche nach Retroviren bieten sich neben dem Elektronenmikroskop der enzymatische Nachweis einer Reversen Transcriptase sowie immunologische Methoden an. Letztere beruhen auf der Tatsache, daß die Strukturproteine von Retroviren phylogenetisch nah verwandter Spezies sehr ähnlich sind. In der Vermutung, daß menschliche Retroviren am ehesten mit Primatenviren zu vergleichen sind, gelang es Kurth et al.(1977), Antikörper gegen interspezies-spezifische Determinanten der Hüllproteine des Simian Sarkom Virus Komplexes (SSV/SSAV) in menschlichen Seren verschiedener Herkunft nachzuweisen. Dabei fiel besonders die Gruppe der Teratocarcinompatienten durch einen signifikant erhöhten Antikörpertiter auf. Trotz damals weltweiter Enttäuschungen auf diesem Forschungsgebiet, gaben die Ergebnisse den ersten Anstoß, die Suche nach humanen Oncoviren auf Teratocarcinomzellen zu konzentrieren. Später zeigten genauere Untersuchungen, daß die gemessene Immunantwort vermutlich gegen den Kohlehydratanteil des Glykoproteins, nicht gegen den Proteinanteil gerichtet ist. Es wurden also keine virusindizierten, sondern sogenannte heterophile Antikörper aufgespürt, die durch eine Vielzahl von Antigenen induziert werden können (J. Löwer et al., 1981).

Das Teratocarcinomsystem erschien aber noch aus einem zweiten Grund als ein geeignetes Modell für die Suche nach menschlichen Oncoviren. Teratocarcinome gehören zu den Keimzelltumoren, die in Anlehnung an Dixon und Moore (1953) sowie Pierce (1976) etwa wir folgt eingeteilt werden können:



Mit Blick auf die C-Typ ähnlichen Partikel in Plazenten erschien vor allem die Tatsache interessant, daß die Teratocarcinomstammzellen in Trophoblastenabkömmlinge differenzieren können. Da es in der Vorbereitung zu dieser Arbeit nicht gelungen war, Plazentazellen sowohl von Termplazenten wie auch von Plazenten des ersten Schwangerschaftsdrittels in Langzeitkultur zu nehmen, wurde der Versuch unternommen, Teratocarcinome zu explantieren. Es konnte erwartet werden, daß

1. es leichter möglich wäre, von malignen Stammzellen permanente Zellkulturen zu etablieren;

2. ein Teil der Zellen eine Entwicklung in Richtung auf Trophoblasten beginnen und damit wie in der Plazenta die Expression von Retroviruspartikeln ermöglichen konnte.

E R G E B N I S S E

I. Teratocarcinome in Zellkultur

A. Etablierung der Tübinger Teratocarcinomlinien

Dank der freundlichen Bereitschaft von Herrn OA Dr. R. Harzmann von der urologischen Abteilung der Universität Tübingen war es möglich, im Zeitraum 1978/79 Operationsmaterial von Patienten mit Verdacht auf Hodentumoren zu erhalten, in einigen Fällen auch von Lymphknotenmetastasen. Histologische Diagnosen des Pathologischen Instituts hatten die Proben als Seminome, Leydigzelltumore, embryonale Carcinome, Teratocarcinome sowie eine Hodenquetschung ausgewiesen. Leider ist es trotz Anwendung verschiedener Kultivierungsmethoden bisher nur bei den Teratocarcinomen gelungen, optimale Bedingungen für die Überführung von Primärkulturen in stabile Langzeitkulturen zu finden.

Bei der Kultivierung von Teratocarcinomen erwies sich die Auswahl des Gewebematerials als sehr wichtig. Am leichtesten ließen sich Langzeitkulturen aus Bereichen des Operationsmaterials etablieren, die schwammig, rot und porös aussahen, weiche Konsistenz hatten und viele Cysten enthielten.

Das steril entnommene Untersuchungsmaterial wurde während des Transportes von den Kliniken ins Labor in Physiologischer Kochsalzlösung gekühlt. Nach Zerkleinerung der Gewebestückchen mit feiner Schere und Pinzette wurden die Zellklümpchen mit einer Pipette schonend resuspendiert und auf mehrere Gewebekulturgefäße verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 35°C im CO_2-begasten Brutschrank in modifiziertem Dulbeccos Minimal Essential Medium, das mit 10% bis 20% fötalem Kälberserum, 10% Tryptosephosphatbouillon und 1% Glutamin angereichert war. Die Erfahrung lehrte, daß Teratocarcinomzellen nur dann anwuchsen, wenn der pH-Wert des Mediums neutral bis leicht sauer war (pH 7 bis pH 6,4). Geschlossene Systeme wie die Gewebekulturflaschen mußten wegen des erschwerten Gasaustausches zusätzlich mit CO_2 versetzt werden.

Bildtafel 2 zeigt am Beispiel der Linie HL Primärkulturen von Teratocarcinomen in den ersten Wochen. Aus den winzigen Gewebebrocken sind vor allem Fibroblasten ausgewachsen (2a). Dazwischen finden sich Nester mit epitheloiden Zellen, die offensichtlich durch Flüssigkeitsabsonderung blasige Vesikel und kuppelförmige Aufstülpungen des Zellrasens bilden, sogenannte Dome (2b). Nicht abgesetzte Gewebebrocken wurden nach einigen Tagen aus den Kulturgefäßen abgegossen und nach wiederholten Aussaatversuchen verworfen.

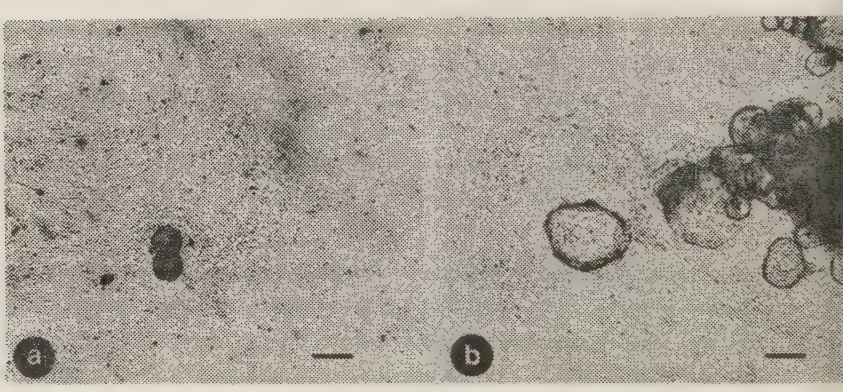


Bild 2 Primärkulturen von Teratocarcinomen am Beispiel von HL

a) Nester mit epitheloiden Zellen zwischen Fibroblasten
b) Dom- und Vesikelbildung

Balken: 250µm

Während des Transportes und der Zerkleinerungsprozedur konnte auch das " spilling " (Lasfargues, 1975), das Herausfallen von Tumorzellen beobachtet werden. Zellen und ganze Cysten lösten sich aus dem Gewebeverband (3a). Diese Cysten wuchsen in Kulturgefäßen zu Bereichen mit reinen Tumorzellen aus (3b). Leider waren fibroblastenfreie Primärkulturen oftmals in ihrem Wachstum gehemmt und gingen nicht selten ganz zugrunde.

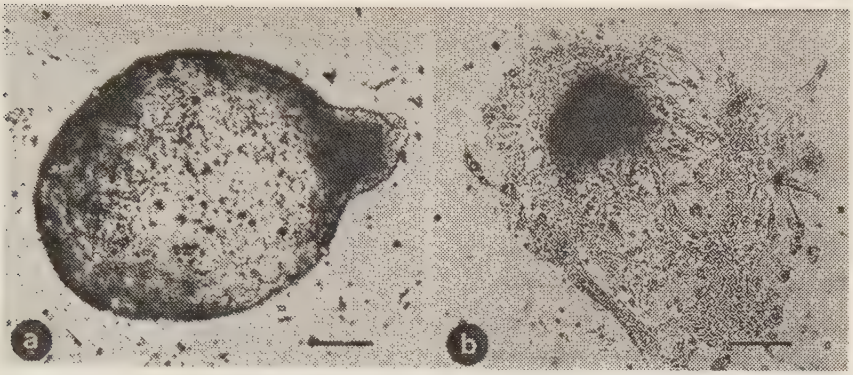


Bild 3 "Spilling" von Tumorzellen am Beispiel der Linie GH

a) Aussaat intakter Cysten ergibt
b) fibroblastenfreie Zellareale

Balken : 100 µm

Dieses Ergebnis bestätigt die Erfahrung vieler Autoren, daß die Fibroblasten aus dem Tumorstroma ein notwendiger, wenngleich problematischer Bestandteil bei der Inkulturnahme epitheloider Tumorzellen sind. Auf der einen Seite vermögen ihre Stoffwechselprodukte die Proliferation von Epithelzellen positiv zu beeinflussen: so werden zum Beispiel bei der Kultur von Teratocarcinomzellen der Maus inaktivierte embryonale Fibroblasten als " feeder layer " eingesetzt (Martin und Evans, 1974). Auf der anderen Seite können die schnell wachsenden Fibroblasten die Epithelzellen aus den Kulturen verdrängen, vielleicht, indem sie sie durch Überdecken mit Collagen am Wachstum hindern (Lasfargues, 1975).

Subkultivation der Primärkulturen durch Ablösen des Zellrasens mit Trypsin-Versen begünstigte die Proliferation der Fibroblasten und bewirkte, daß die Tumorzellen nach mehreren Passagen ganz verschwunden waren.

Dagegen führte die folgende Methode zur Etablierung von drei neuen Teratocarcinomzellinien:
Die Primärkulturen wurden einige Wochen mit häufigen Mediumwechseln in denselben Kulturflaschen gehalten. Dabei unterlagen die Fibroblasten einem Alterungsprozeß wie Bildtafel 4a zeigt. Sie lösten sich in Fetzen von den Kulturgefäßen und verloren nach und nach

ihre Lebensfähigkeit. Die epitheloiden Zellen mit ihrer Fähigkeit, Dome und Vesikel zu bilden, haben unter diesen Kulturbedingungen einen Wachstumsvorteil. Die Vesikel schnüren sich ab und gehen in den Kulturüberstand. Die Dome lassen sich ebenfalls leicht ablösen, indem man mit der Hand gegen das Kulturgefäß schlägt oder sie mit einem Mediumstrahl aus der Pipette abbläst. Durch Zentrifugieren des Kulturüberstandes (5 - 10 Minuten bei etwa 25 g) und Wiederaussäen des Pellets (4b) in neue Kulturflaschen gelang es, die Dom und Vesikel bildenden Zellen gegenüber den Fibroplasten anzureichern. Nach etwa 3 bis 5 Monaten waren alle Kulturen frei von Fibroblasten (4c).

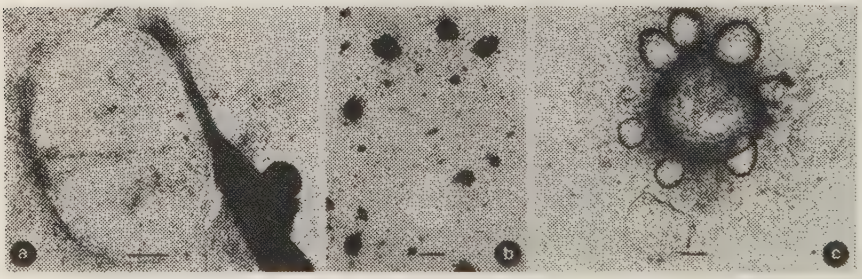


Bild 4 Subkultivierung von Teratocarcinomen am Beispiel von GH

a) Abreißen der Fibroblasten in den Langzeitkulturen
b) Wiederaussaat des abgeklopften Materials
c) Fibroblastenfreie Kulturen nach 3 - 5 Monaten

Balken : 250 µm

Die Methode der Subkultivierung durch Abklopfen wurde weiterhin beibehalten. Bildtafel 5 zeigt das typische Erscheinungsbild der etablierten Teratocarcinomzellinien: Nach der Aussaat fleckenförmiges Wachstum (5a) der rundlichen bis ovalen Zellen mit großen Kernen, auffälligen Nukleoli und schmalem Cytoplasmasaum (5b), sowie die starke Tendenz zur Dom- und Vesikelbildung bei den konfluenten Kulturen (5c und d).

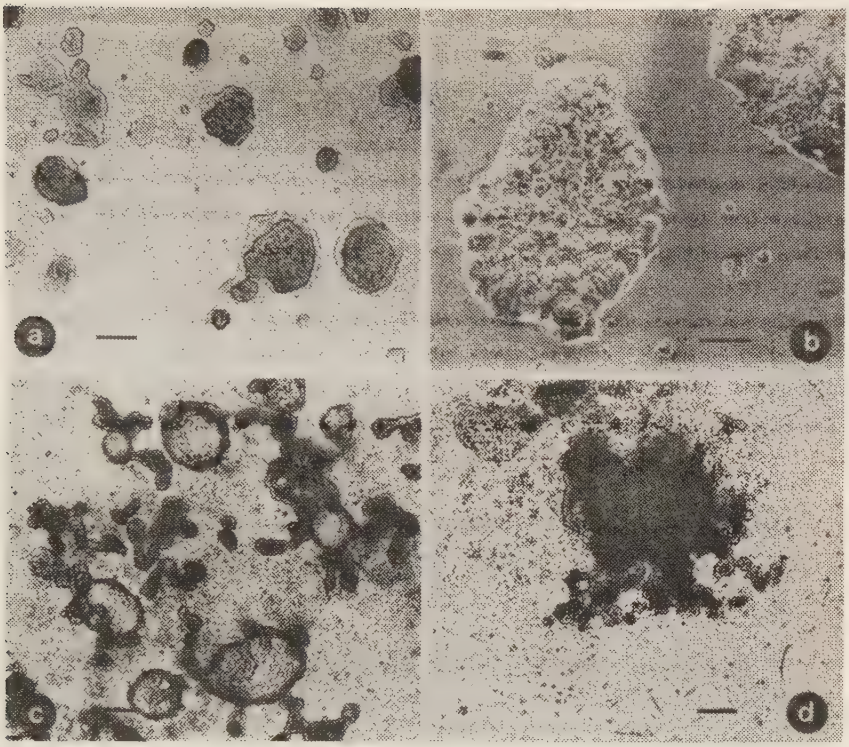


Bild 5 Etablierte Teratocarcinomzellinien

a) fleckenförmiges Wachstum nach Aussaat am Beispiel von HL
b) rundlicher Zelltyp mit großem Kern am Beispiel von HL
c) Dom- und Vesikelbildung am Beispiel von GH
d) Erscheinungsbild der Linie ER

Balken: 250µm (a, c, d) und 25µm (b)

B. Morphologieänderungen durch veränderte Kulturbedingungen

Schon 1978 hatte uns Dr. J. Fogh aus Rye, New York, freundlicherweise seine Teratocarcinomlinien Tera 1 (Passage 51) und Tera 2 (Passage 30) überlassen (Fogh und Trempe, 1975; Fogh 1971). Diese bilden konfluente Monolayer aus rundlichen, den Tübinger Linien ähnlichen Zellen bei Tera 1 oder etwaskleineren, mehr dreieckigen Zellen bei Tera 2. Beide werden durch Ablösen des

Zellrasens mit Trypsin-Versenlösung subkultiviert.
Im Laufe der Untersuchungen ergab sich die Frage, ob Tera 1 und 2 ebenso wie die Tübinger Linien zur Dom- und Vesikelbildung fähig sind. Konfluente Monolayerkulturen wurden nach der oben beschriebenen Methode längere Zeit unter häufigem Mediumwechsel ohne Subkultivierung in denselben Kulturflaschen gehalten. So konnte erreicht werden, daß die Tumorzellen übereinander wuchsen und einen allmählichen Differenzierungsprozeß durchmachten. Tera 1 zeigte bereits nach einigen Wochen ausgeprägte Dom- und Vesikelbildung, wie Bildtafel 6 dokumentiert.

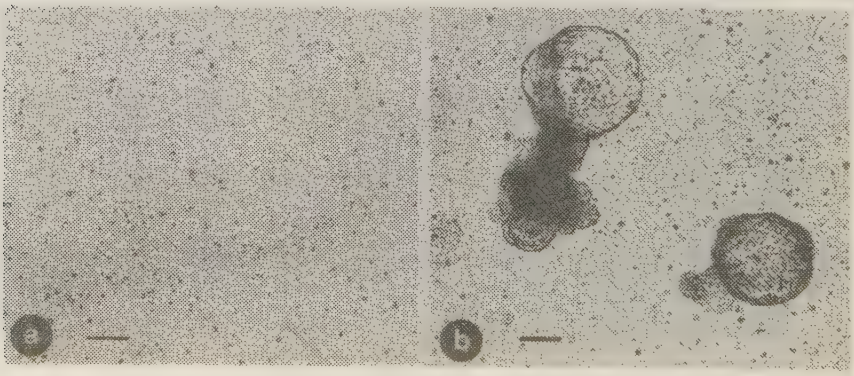


Bild 6 a) Tera 1 Monolayerkultur, Passage 80
b) Dom- und Vesikelbildende Linie nach Langzeitkultur

Balken : 250 µm

Bei der Linie Tera 2 dauerte die Entwicklung zu einem den Tübinger Linien ähnlichen Erscheinungsbild etwa ein halbes Jahr (siehe Bild 7). In den Kulturen traten dabei organoide Strukturen mit verschiedenen Zelltypen auf, wie sie bei Untersuchungen von pluripotenten Teratocarcinomlinien der Maus beschrieben worden sind. Dies Phänomen wird ausführlicher in Kapitel VI A dargestellt.

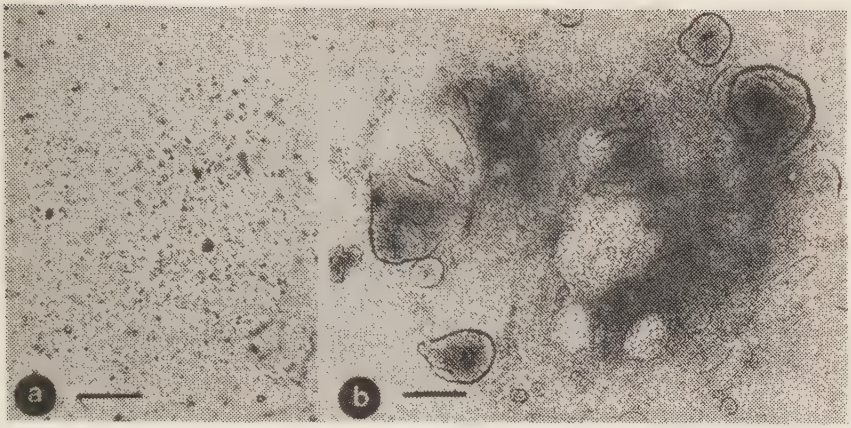


Bild 7 a) Tera 2 Monolayerkultur Passage 56
b) Dom- und Vesikelbildende Linie nach einem halben Jahr Langzeitkultur

Balken : 250µm

Umgekehrt konnte man bei den etablierten Tübinger Linien durch vorsichtiges Gewöhnen der Zellen an schnelles Subkultivieren mit Trypsin-Versenlösung die Dom- und Vesikelbildung unterdrücken und auf ein morphologischen Erscheinungsbild selektionieren, das dem Monolayerbild der Linie Tera 1 ähnelte.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die für diese Arbeit verwendeten Teratocarcinomzellinien:

Tabelle 1

Linie	Etablierung	Tumorpathologie
Tera 1	1970 durch J. Fogh in Rye, New York als Monolayerkultur	Teratocarcinom/ Lungenmetastase
Tera 2	1971 durch J. Fogh in Rye, New York, als Monolayerkultur	Teratocarcinom/ Lungenmetastase
GH	Februar 1979 in Tübingen als Multilayerkultur	Teratocarcinom/ Hoden
HL	Juni 1979 in Tübingen als Multilayerkultur	Teratocarcinom/ Hoden
ER	September 1979 in Tübingen als Multilayerkultur	Teratocarcinom/ Hoden und Lymphknotenmetastase

II. Teratocarcinomzellen produzieren C-Typ ähnliche Partikel

A. Nachweis im Elektronenmikroskop

Zwei Methoden bieten sich an, um in Zellkulturen routinemäßig nach der Expression von Retroviren zu suchen: Identifizierung der Viren im Elektronenmikroskop auf Grund ihres morphologischen Erscheinungsbildes sowie durch den biochemischen Nachweis einer RNS abhängigen DNS Polymerase, dem viralen Markerenzym.

Der Nachweis von Viren in Ultradünnschnitten von Zellkulturen ist eine empfindliche, aber sehr arbeitsintensive und mühsame Methode. Bei genügend ausdauernder und intensiver Suche kann jedoch gelegentlich noch eine minimale Partikelproduktion, die im Enzymtest bereits negativ erscheinen würde, entdeckt werden. Obwohl Dr. Fogh in seinen Teratocarcinomlinien keine Virusexpression gefunden hatte, wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Frank von der Elektronenmikroskopischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Virusforschung, Tübingen, noch einmal gründliche elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Gelegentlich in den Kulturen auftauchende Syncytien hatten die Hoffnung geweckt, daß einige Tumorzellen in Trophoblastenabkömmlinge differenzieren können. In Trophoblasten aber war Partikelexpression zu vermuten.

Ende 1978 zeigten die ersten Untersuchungen von Ultradünnschnitten eine äußerst geringe spontane Produktion von Partikeln mit C-Typ ähnlicher Struktur bei der Monolayerlinie Tera 1 : in insgesamt etwa 20 stündiger Suche wurde ein einziges Partikel gefunden (siehe Bild 8a).
Aus Studien mit animalen Oncoviren sind mehrere Chemikalien bekannt, die eine Virusexpression auslösen bzw. verstärken können (Lowy et al., 1971; Aaronson und Stephenson, 1976). Durch das in Material und Methoden beschriebene Induktionsschema wurden bei der Monolayerlinie Tera 1 mehr Zellen zu Partikelproduktion angeregt und diese deutlich erhöht (siehe Bild 8b).

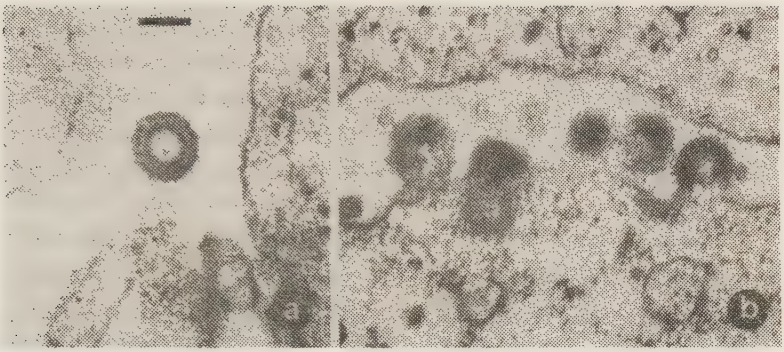


Bild 8a) Partikelproduktion in uninduzierten Tera 1 Monolayerkulturen

b) Partikelproduktion in induzierten Tera 1 Monolayerkulturen

Balken: 100 nm

Wirkstoffe des Induktionsmediums sind:

1. das basenanaloge Joddesoxyuridin, ein Mutagen, das durch seinen Einbau in die DNS die Expression von Genen verändern und so vor allem reprimierte endogene Viren aktivieren kann (Teich et al., 1973);
2. das Glucocortikoid Dexamethason, das z.B. im Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-System durch Eingriff in die Genregulation die Menge der Virussynthese drastisch erhöht (Scolnick et al., 1976);
3. der Differenzierungsinduktor Dimethylsulfoxyd des Friend Erythroleukämie Virus Systems (Colletta et al., 1979).

Trotz Induktion blieb die Anzahl der Partikel gering, verglichen etwa mit der Vielzahl an Viren, die in Ultradünnschnitten von Zellen zu sehen sind, die mit dem endogenen Pavianvirus BEV oder dem Mäuseleukämievirus MuLV infiziert sind. Die Monolayerlinie Tera 2 konnte nicht zur Partikelproduktion angeregt werden. Diese Beobachtungen sind konform mit den Ergebnissen von Bronson et al., die 1978 und 1979 ebenfalls Partikel mit C-Typ ähnlicher Struktur in Teratocarcinomzellen nachgewiesen haben.

Sobald in den Tübinger Linien GH, HL und ER genügend Tumorzellen für elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Verfügung standen, konnte in etlichen Zellen spontane Partikelproduktion gefunden werden. Diese ließ sich durch Induktion noch verstärken. Selektion auf Dom und Vesikel bildende Linien scheint zugleich Selektion auf Zellen zu sein, die zur spontanen Partikelbildung fähig sind.

Die lichtmikroskopische Beobachtung, daß Tera 1 Monolayerkulturen während der Induktionsprozedur morphologische Veränderungen in Richtung auf Dombildung aufweisen (siehe Bild 9), führte zu dem im vorigen Kapitel beschriebenen Versuch, die amerikanischen Zelllinien zur Dom- und Vesikelbildung anzuregen. Ziel war, eine erhöhte Spontanproduktion von Partikeln zu erreichen. Dies gelang und schließlich konnten sogar bei der Linie Tera 2, die bisher als nicht produzierend galt (Bronson et al., 1979), Partikel nachgewiesen werden.

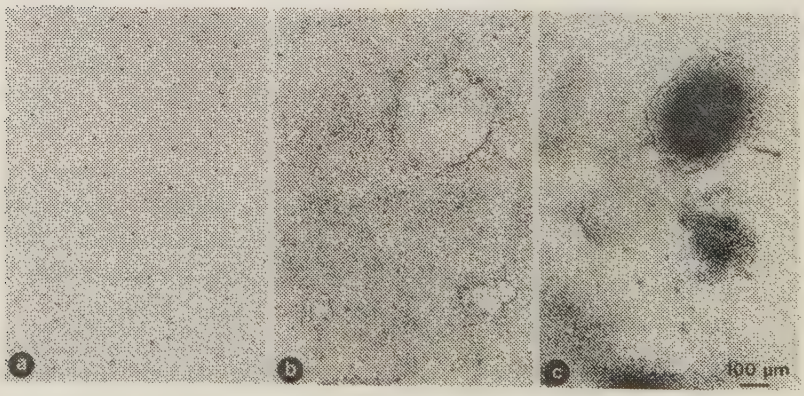


Bild 9 a) Tera 1 Monolayerkultur
b,c) Morphologieänderung nach Induktion

Elektronenmikroskopische Abschätzungen zeigen jedoch, daß selbst nach Induktion immer nur ein Teil der Zellen Partikelproduktion zuläßt. Ihr Anteil schwankt von wenigen Prozent bei der Linie Tera 2 bis zu etwa 20% bei der Linie GH. Auffällig ist, daß die Partikel vorwiegend in interzelluläre Räume hineinknospen. Selten finden sie sich an freien Oberflächen der Zellen, manchmal auch in intracytoplasmatischen Vesikeln.
Die Partikel werden nach ihrer Herkunft als Human-Teratocarcinoma-Derived Particles HTD-1 bis -5 bezeichnet. Sie unterscheiden sich, soweit man das auf den Ultradünnschnitten beurteilen kann, kaum in ihren strukturellen Besonderheiten (siehe Bild 10).

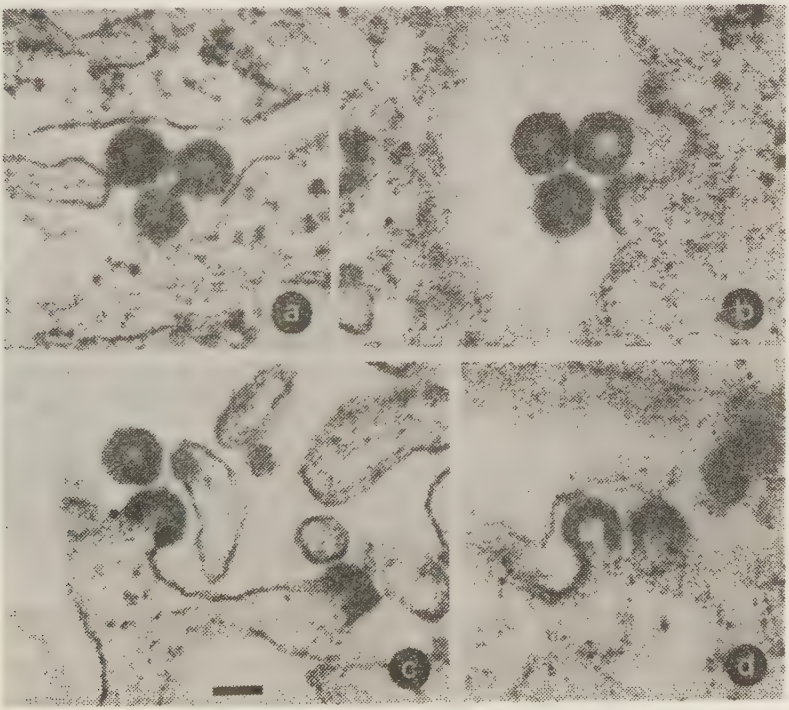


Bild 10 a) HTD-2 aus Tera 2 b) HTD-3 aus GH
c) HTD-4 aus HL d) HTD-5 aus ER

Balken : 100 nm

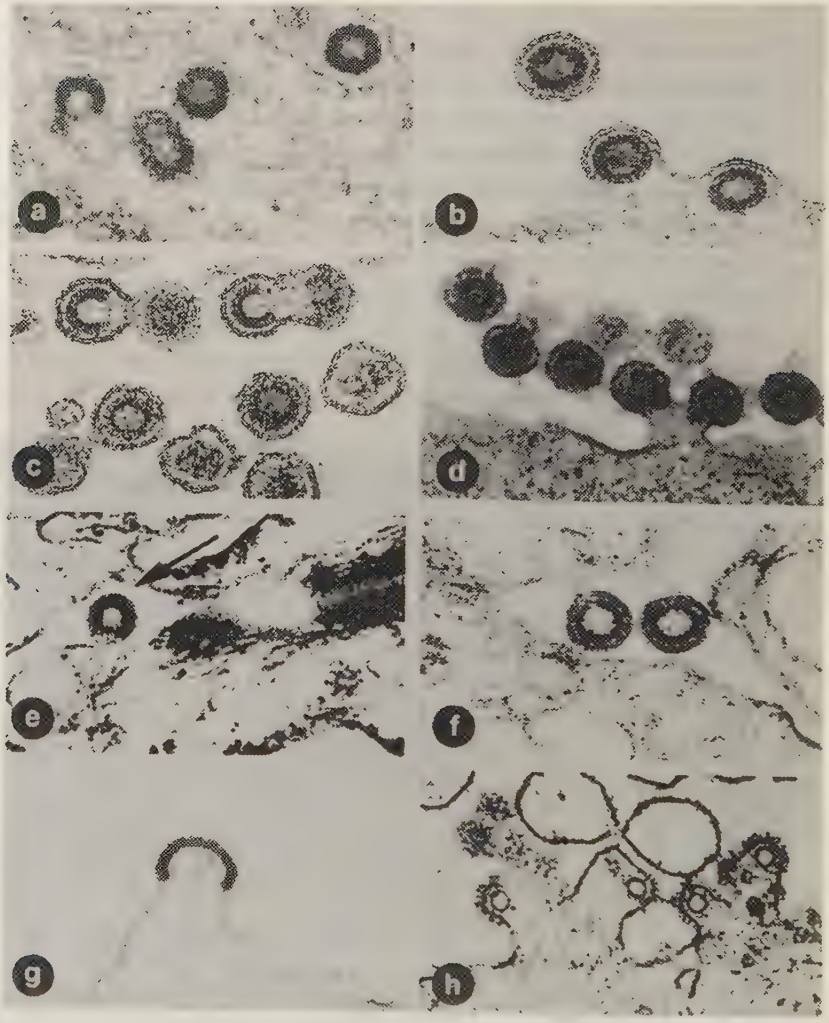


Bild 11 Vertreter der Retroviridae, Morphologievergleich

a - f Oncovirinae:
a) Intracisternale A-Partikel
b) B-Typ Viren (Mouse Mammary Tumor Virus)
c) C-Typ Viren (Friend Murine Leukemia Virus)
d) D-Typ Viren (Mason Pfizer Monkey Virus)
e) Plazenta Partikel
f) HTD-3 Partikel
g) Lentivirinae (Maedi Visna Virus)
h) Spumavirinae (Simian Foamy Virus Typ 6)

Anmerkungen: Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Dr. H. Frank, Tübingen (a-c), Dr. H. Gelderblom, Berlin (d), Dr. F. Weiland, Tübingen (g), Abbildung e aus Dirksen und Lewy (1977), Abbildung h aus Hooks et al. (1972).

B. C-Typ Morphologie der Partikel

Die Klassifikation der Retroviridae beruht unter anderem auf charakteristischen morphologischen Unterschieden zwischen den Stämmen (Bernhard, 1960; Schidlovsky, 1977). Bild 11 zeigt typische Vertreter der Unterfamilien Lentivirinae, Spumavirinae und Oncovirinae.

Morphologisch gehören die Teratocarcinompartikel zu den Oncovirinae. Intracytoplasmatische Vorläufer und das Knospen mit ringförmigem Core, das bei B- und D-Typ Viren die Regel ist, wurden nicht beobachtet. Die Virushülle der HTD Partikel weist im Gegensatz zu der von B-Typ und Spumaviren keine prominenten Spikes auf. Dagegen findet man die charakteristischen halbmondförmigen Buddingstrukturen der C-Typ Viren, die durch den Aufbau des Viruscores unterhalb der Zellmembran hervorgerufen werden. Der Durchmesser der HTD-Partikel beträgt etwa 120 nm. Sie besitzen eine Virushülle mit der typischen Struktur einer Elementarmembran sowie einen inneren, stark durch Uranylacetat anfärbbaren Ring, vermutlich das Ribonukleinprotein. Auffällig ist jedoch, daß der helle Raum zwischen Virusinnenkörper und Virushülle fehlt, eine Besonderheit, die sie mit den allerdings wesentlich kleineren intracisternalen A-Partikeln IAP teilen. Auch konnten bisher keine kollabierten Cores, das Zeichen für einen abgeschlossenen Reifungsprozess der Viren und ihrer Ablösung von der Zelle, gefunden werden. Die Partikel haben die gleichen strukturellen Eigenschaften wie die Plazentapartikel (Dalton et al., 1974) und die von Bronson et al. (1978, 1979) beschriebenen Teratocarcinompartikel.

Bild 12 verdeutlicht noch einmal die Ähnlichkeit des Buddingprozesses, aber auch die strukturellen Unterschiede von HTD-Partikeln und klassischen C-Typ Viren (als Beispiel wurde das endogene Pavianvirus BEV gewählt).

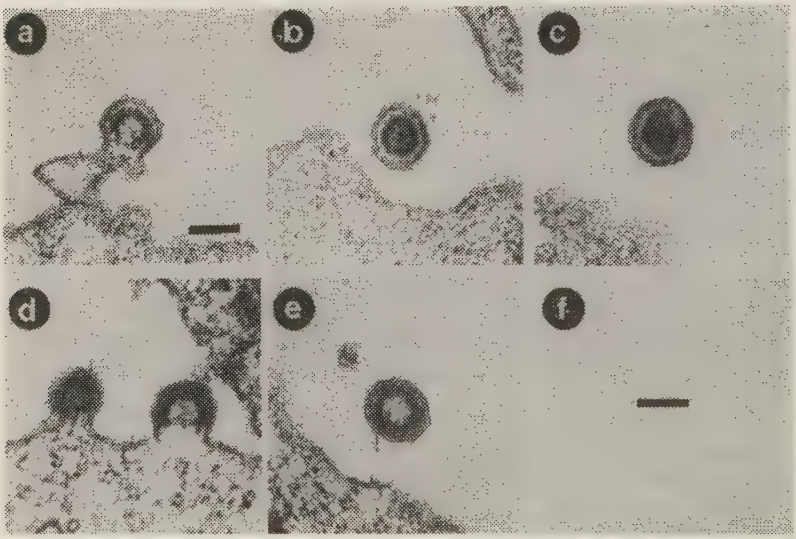


Bild 12 Vergleich von C-Typ Viren (obere Reihe)
mit HTD-Partikeln (untere Reihe)

a + d): Buddingstrukturen
b + e): Ablösungsprozess
c + f): Kollabierte Cores

Balken : 100 nm

Tabelle 2 faßt die bisherigen Ergebnisse zusammen. Sie spiegelt die Menge an produzierten Partikeln an Hand elektronenmikroskopischer Abschätzungen wider.

Tabelle 2

Linie	Wuchsform	Partikel	Partikelproduktion vor Induktion	nach Induktion
Tera 1	Monolayer Passage 50 ff	HTD 1	(+)	++
Tera 1	Multilayer	HTD 1	nicht getestet	++
Tera 2	Monolayer Passage 30 ff	HTD 2	-	-
Tera 2	Multilayer	HTD 2	(+)	+
GH	Multilayer	HTD 3	++	+++
GH	Monolayer Passage 0-15	HTD 3	+	++
HL	Multilayer	HTD 4	+	++
ER	Multilayer	HTD 5	(+)	+

Die Kreuze stellen ein willkürliches Maß für die Häufigkeit der Partikel in Ultradünnschnitten dar:

(+) : gelegentlich sind nach langem Suchen Partikel zu finden

+++ : innerhalb einer halben Stunde sind in einigen Schnitten Partikel zu finden.

III. Nachweis einer RNS abhängigen DNS Polymerase

Biochemisch lassen sich die Retroviridae unter anderem durch ihr Markerenzym Reverse Transcriptase charakterisieren. Für die Zuordnung der HTD Partikel zu dieser Virusgruppe ist deshalb der Nachweis eines solchen Enzyms von entscheidender Bedeutung.

RNS abhängige DNS Polymerasen katalysieren in vivo und in vitro die Transcription viraler RNS in doppelsträngige DNS in Gegenwart von allen vier desoxy-Nukleotiden, zweiwertigen Ionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}) und Primern der DNS Synthese (t-RNS in vivo, in vitro z.B. Kalbsthymus-DNS-Primer mit einer Länge von 4-8 Nukleotiden). Vereinfacht läuft die Reaktion im ersten Schritt nach folgendem Schema:

$$n \begin{pmatrix} dATP \\ dCTP \\ dGTP \\ dTTP \end{pmatrix} + RNS \xrightarrow[Mg^{2+},\ Primer]{Polymerase} RNS - \begin{pmatrix} dAMP \\ dCMP \\ dGMP \\ dTMP \end{pmatrix} n + nPP_i$$

In einem zweiten Schritt wird an der Vorlage des Polydesoxyribonukleotidstranges der zweite DNS Strang synthetisiert und die RNS durch die RNase H-Aktivität der Reversen Transcriptase abgebaut. Durch den Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden, vorzugsweise dTTP oder dGTP, in säurefällbares Material läßt sich die Reaktion messen.

A. Partikelreinigung

Voruntersuchungen mit animalen Retroviren hatten gezeigt, daß die Möglichkeit, im Reverse Transcriptase Test eine Aktivität zu messen, korreliert ist mit der elektronenmikroskopisch abgeschätzten Menge an produziertem Virus. Synthetisieren die zu untersuchenden Linien sehr viel Virus, so läßt sich der Enzymnachweis direkt aus dem Kulturüberstand der Zellen führen. Je weniger Viren produziert werden, desto mehr müssen Methoden zur Konzentration und Reinigung der Partikel zur Anwendung gelangen. Doch selbst dann sind bei sehr schwach produzierenden Linien falsch negative Ergebnisse nicht auszuschließen.
Nach elektronenmikroskopischen Abschätzungen gehören die Teratocarcinomlinien zu den schwach produzierenden Zelltypen. Dazu kommt,

daß mehr Buddingstrukturen als abgelöste Partikel zu finden sind und die Partikel häufiger in Interzellularräume als ins Medium abgegeben werden. Um überhaupt eine positive Antwort erwarten zu konnen, ist daher eine starke Partikelanreicherung durch Ultrazentrifugation großer Mengen Kulturüberstandes notwendig.

Für diese Aufgabe standen zunächst nur die Tera 1 Monolayerkulturen zur Verfügung, die in ausreichender Menge kultiviert werden konnten. Pro Versuchsreihe wurden mindestens 20 Corning Rollerflaschen mit einer Fläche von 490 cm^2 pro Flasche induziert.
Für jedes Experiment wurden sechsmal hintereinander Partikel aus 4 Stunden altem Kulturüberstand nach Abzentrifugieren der Zellbruchstücke in der Ultrazentrifuge pelletiert. Resuspension erfolgte mit moglichst wenig Puffer. Bei den nachfolgenden Zentrifugationen wurde dazu die bereits gewonnene Suspension eingesetzt. So konnte auf eine hohe Anreicherung relativ frisch ins Medium abgegebener Partikel gehofft werden. Zur weiteren Konzentrierung und Reinigung der HTD 1 Partikel wurde die charakteristische Eigenschaft der Retroviridae ausgenutzt, im linearen Saccharosegradienten bei einer Dichte von 1,16 g/ccm zu banden. Freie Cores, die bei Zerstörung der Virushülle entstehen, banden bei etwa 1,24 g/ccm. Das resuspendierte Pellet wurde auf einen 20 - 55 % (w/w) Saccharosegradienten geschichtet, im Vertikalrotor zentrifugiert und fraktioniert. Erneutes Pelletieren ermöglichte, die einzelnen Fraktionen vollständig im Enzymtest einzusetzen. Nähere Einzelheiten sind in Material und Methoden beschrieben.
Ob die durch dies Verfahren erreichte starke Anreicherung allerdings voll zum Tragen kommen kann, ist fraglich, da durch die Zentrifugationskräfte auch viele Partikel zerstört werden können.

B. Nachweis einer Enzymaktivität mit synthetischen Template-Primern (exogene Reaktion).

1971 konnten Baltimore et al. sowie Goodman et al. zeigen, daß RNS abhängige DNS Polymerasen nicht nur virale RNS als Template-Primer akzeptieren, sondern auch synthetische Homoribopolymere mit Oligodesoxynukleotidprimern mit sehr viel größerer Effizienz ablesen. Die Verstärkung der Enzymreaktion, die in manchen Systemen 100fach und mehr sein kann, ist abhängig von einer optimalen Konzentration der zweiwertigen Ionen Mg^{2+} oder Mn^{2+} (Verma,

1977). Diese Optima sind jedoch für jedes System verschieden und müssen austitriert werden. Nachteil des Einsatzes synthetischer Template-Primer ist die Tatsache, daß auch andere zelluläre Polymerasen in gewissem Maße Homopolymere abzulesen vermögen und so falsch positive Ergebnisse vorgetäuscht werden können. Besonders wichtig erscheint eine Abgrenzung zu der von Fridlender et al. (1972) beschriebenen Polymerase γ , die zwar keine natürliche RNS ablesen kann, aber ähnlich wie die Reverse Transcriptase fast alle synthetischen Homoribopolymere als Template akzeptiert (Robert-Guroff et al., 1977).
Eine Ausnahme scheint das 1974 von Gerard et al. in seiner Spezifität untersuchte Poly (2' O-methylcytidylat)-Oligodesoxyguanylat $\left((rCm)_n\ (dG)_{12-18}\right.$ oder $\left.rCmdG\right)$ darzustellen. Dies ist bisher der einzige synthetische Template-Primer, mit dem eine RDDP eindeutig nachgewiesen werden kann.
Ein synthetischer Template-Primer, der dagegen nur von der γ Polymerase abgelesen wird, besteht aus einem Polydesoxythymidinstrang mit Oligoadenosinprimern: $(dT)_n(rA)_{13}$.

Auch lassen sich DNS Polymerasen durch den sogenannten Template-Vergleich unterscheiden, mit dem bestimmt wird, ob Homoribopolymere mit Oligodesoxynukleotidprimern besser abgelesen werden als Homodesoxyribopolymere mit Oligodesoxynukleotidprimern.

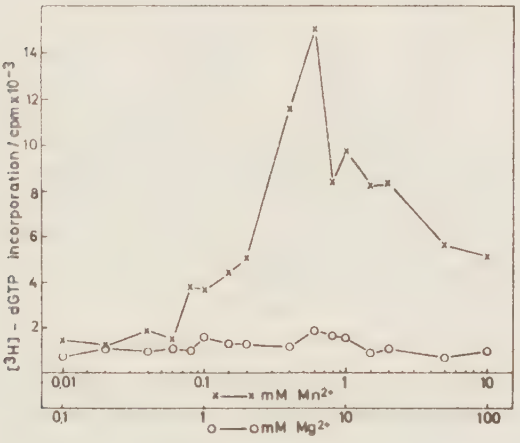
Folgende Tabelle - in Anlehnung an Sarngadharan (1978) - gibt einen Überblick über Kriterien zur Unterscheidung von DNS Polymerasen.

Tabelle 3 Synthetische Template-Primer zur Unterscheidung der DNS Polymerasen

	α	β	γ	RDDP
Natürliche RNS/ Virale RNS	-	-	-	+
$(rCm)_n(dG)_{12-18}$	-	-	-	+
$(dT)_n(rA)_{13}$	-	-	+	-
$\frac{(rA)_n(dT)_{12}}{(dA)_n(dT)_{12}}$	$\ll 1$	< 1	bis 10	bis 100 und mehr

Aus diesen Überlegungen war es naheliegend, bei der Suche nach einer RDDP in den gereinigten Teratocarcinompartikeln, das spezifische Template rCmdG einzusetzen. Um einen möglichst großen Verstärkungseffekt der Enzymreaktion zu erzielen, wurde zuerst durch eine Mn^{2+}/Mg^{2+}- Titration die optimale Ionenkonzentration bestimmt. Die Partikelisolierung erfolgte durch einmaliges Pelletieren des Kulturüberstandes von 20 Corning Rollerflaschen mit induzierten Tera 1-Monolayerkulturen, Passage 90.

Figur 2 zeigt, daß der Einbau von radioaktiv markiertem dGTP in säurefallbares Material in Gegenwart des Template-Primers rCmdG ein breites Optimum im Bereich von 0,4 bis 1,2 mM Mn^{2+}-Ionen (Endkonzentration) aufweist, während Mg^{2+}-Ionen keinen Einfluß auf die Enzymaktivität zu haben scheinen.

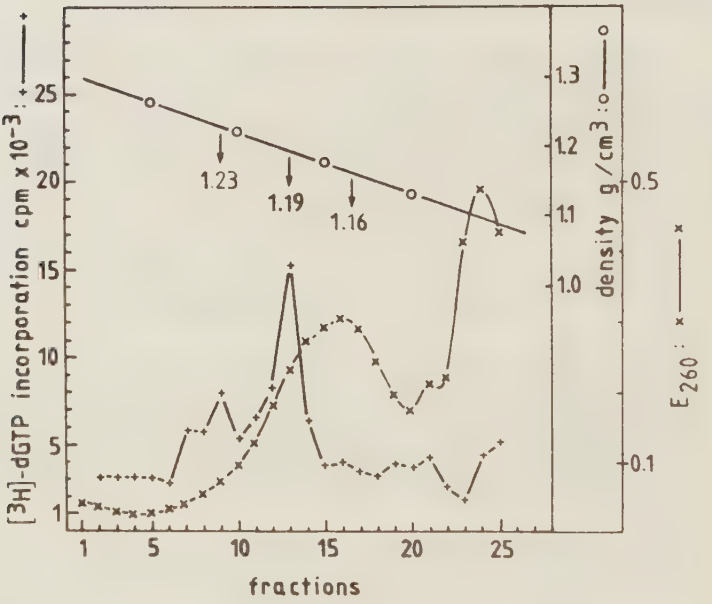


Figur 2 Mg^{2+}/Mn^{2+} - Titration bei HTD-1 Partikeln in Gegenwart von rCmdG

Leider war dies Ergebnis schlecht reproduzierbar, wahrscheinlich weil die Partikel mit nur einem Pelletierungsschritt noch nicht genügend angereichert und gereinigt worden waren. Zur weiteren Konzentration der HTD-1 Partikel wurde das Pellet wie vorher be-

schrieben über einen linearen Saccharosegradienten geschickt und die Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen gemessen.

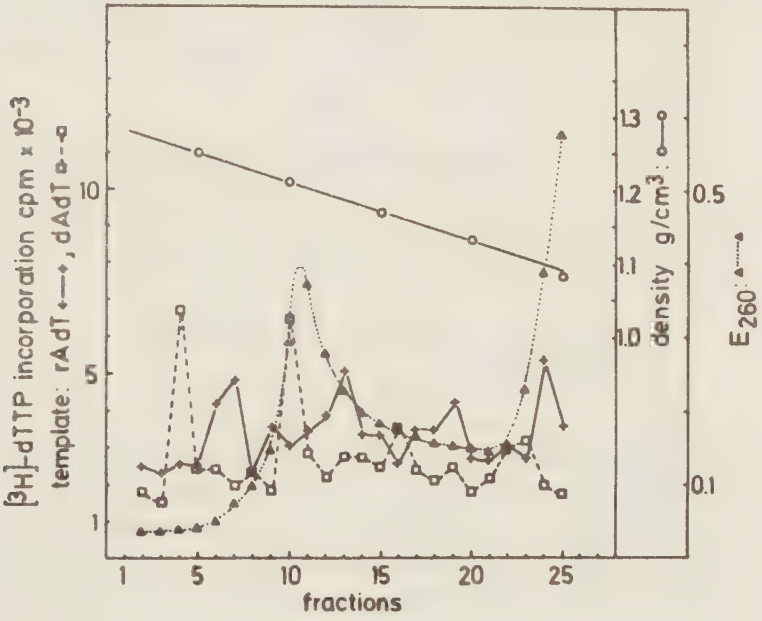
Wie Figur 3 zeigt, ist im 20-55% (w/w) Saccharosegradienten eine RDDP - Aktivität nachweisbar, die bei 1,19 g/ccm banded mit einer Schulter bei 1,24 g/ccm.



Figur 3 RDDP-Aktivität (Template rCmdG) bei HTD-1 Partikeln, gemessen über einen 20-55% Saccharosegradienten

In den anderen Gradientenläufen bandete die Reverse Transcriptase-aktivität bei 1,16 g/ccm und 1,24 g/ccm mit einer zusätzlichen Schulter bei 1,13 g/ccm. Letztere wird auch von Nelson et al. beschrieben, die 1978 RDDP Aktivität in normaler menschlicher Plazenta fanden. Der Nachweis des Enzyms bei höheren und niedrigeren Dichten, sowie in der Corefraktion scheint ein Hinweis darauf zu sein, daß die Partikel durch lange Zentrifugationszeiten und/oder hohe Umdrehungszahlen beschädigt worden sind. J. Löwer konnte ähnliche Beobachtungen bei Versuchen zur Optimierung der Zentrifugationsbedingungen für BEV Partikel machen (persönliche Mit-

teilung). Gerwin et al. beschrieben 1970 ein ähnliches Phänomen, wenn Viren vor der Zentrifugation im Dichtegradienten mit hohen Detergenzkonzentrationen behandelt wurden.
Interessanterweise konnte die Enzymreaktion mit rCmdG nur im Gradienten nachgewiesen werden, nicht jedoch in ein- oder zweifach pelletierten Präparationen (siehe Diskussion).



Figur 4 Templatevergleich (rAdT und dAdT) bei HTD-1 Partikeln, gemessen über einen 20-55% Saccharosegradienten.

Eine weitere Nachweismethode für eine RDDP bietet der Template-Vergleich: das Homoribopolymer rAdT wird 10 bis 100 fach besser abgelesen als das Desoxyanaloge dAdT. Für die HTD-1 Partikel ließ sich jedoch kein eindeutig positiver Template- Vergleich durchführen.

Mehrere Erklärungen sind denkbar:

1. da kein Test für die tatsächliche Partikelkonzentration zur Verfügung steht, können triviale Mengenprobleme nie ganz ausgeschlossen werden.

2. Die RT der HTD-1 Partikel liest synthetische Template-Primer mit geringer Effizienz ab. Damit würde sie sich deutlich von anderen RDDP unterscheiden.

3. Zelluläre Faktoren, die sich auch durch die Dichtezentrifugation nicht vollständig abtrennen lassen, beeinflussen die Ablesbarkeit exogener Template-Primer. Dabei könnte es sich z.B. um RNasen handeln. Gerard berichtet, daß das Template rCmdG im Gegensatz zu anderen synthetischen Template-Primern von RNasen aus Mauszellen nicht angegriffen wird. Nelson et al. beschreiben 1981 das Vorkommen eines allerdings nicht näher identifizierten RT Inhibitors in menschlicher Plazenta.

4. Hemmfaktoren könnten theoretisch auch viral codiert sein.

5. Eine weitere Erklärung, die in der Natur der Partikel begründet ist, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

C. Nachweis einer RNS abhängigen DNS Polymerase durch die endogene Reaktion

Ein starker Hinweis auf das Vorkommen einer RNS abhängigen DNS Polymerase ist die Transcription der viralen RNS, also des natürlichen Templates in komplementäre cDNS während der sogenannten endogenen Reaktion. Diese läuft in meist mit Detergenz behandelten Viren in Gegenwart eines geeigneten Reaktionsgemischs ab, das alle vier Nukleotide und zweiwertige Ionen enthält. Diese Reaktion sollte RNase sensitiv sein. Durch Actinomycin D, einen Farbstoff, der an Basen binden kann und damit die Synthese des DNS-Doppelstranges stört, wird der Einbau radioaktiv markierter Nukleotide deutlich verringert (Verma, 1977). Kalbsthymusprimer stimulieren die Reaktion.
Zweifach pelletierter Kulturüberstand von 20 Corning Rollerflaschen Tera 1 Monolayerkulturen wurde im Test eingesetzt. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der endogenen Reaktion mit HTD 1 Partikeln. Sie sind ausgedrückt in cpm H^3 dTTP-Incorporation, wobei der Leerwert abgezogen wurde.

Tabelle 4 Endogene Reaktion von HTD-1 Partikeln

Anzahl Nukleotide	2	4	4	4	4	4
Detergenz	+	-	+	+	+	+
RNase	-	-	-	+	-	-
Actinomycin D	-	-	-	-	+	-
Kalbsthymusprimer	-	-	-	-	-	+
Ergebnis in cpm	153	16944	17781	22425	9329	27683

Übereinstimmend mit der Erwartung ist die endogene Reaktion abhängig von allen vier Nukleotiden.
Sie wird durch Kalbsthymusprimer stimuliert. Actinomycin D hemmt die Doppelstrangsynthese.
Überraschenderweise scheint jedoch eine Detergenzbehandlung ohne Einfluß auf die endogene Reaktion der HTD 1 Partikel zu bleiben, denn eine Inkubation mit 0,1% NP für 10 Minuten bei 4°C vor dem Test verändert die Enzymaktivität nicht. Das Ausbleiben einer Aktivierung oder Hemmung der Reaktion wäre denkbar, wenn die Partikel so fragil wären, daß sie bereits spontan zerfallen. Dies müßte jedoch gleichzeitig bedeuten, daß die Nukleinsäuren freigesetzt und damit dem Angriff von Nukleasen zugänglich gemacht würden. Da aber Zugabe von RNase A die Enzymaktivität nicht vermindert, spricht im Gegenteil vieles für eine außergewöhnliche Stabilität der Partikel. Sie scheinen selektiv durchlässig zu sein für kleine Moleküle wie Nukleotide (MG 350),Actinomycin D (MG 1250), während große Moleküle wie RNasen (MG 13700) nicht eindringen können.

Eine große Stabilität der HTD 1 Partikel bietet neben der Hemmfaktorhypothese eine andere Erklärung für die Schwierigkeiten, in der exogenen RT Reaktion eine positive Enzymantwort zu erhalten. Synthetische Template- Primer können nur bei Zerfall der Partikel und Freiwerden der RDDP abgelesen werden. Dieser Prozeß ist offensichtlich bei den HTD 1 Partikeln erschwert, denn allen bisher beschriebenen Versuchen ging eine Inkubation mit Detergenz voraus. Weitere Klärung dieser Denkansätze war wegen der Mengenprobleme nicht möglich. Es bleibt daher auszutesten, in wieweit eine

veränderte Detergenzbehandlung die exogene und endogene Reaktion zu beeinflussen vermag, und ob dann durch RNasebehandlung die RNS Natur des endogenen Templates bewiesen werden kann. Bessere Charakterisierung der Polymerasereaktion sowie der Nachweis einer viralen RNS eventuell mit anderen Methoden sind notwendig, um die Zuordnung der HTD Partikel zu den Retroviridae zu rechtfertigen.

Im folgenden sind noch einmal die Eigenschaften der HTD Partikel am Beispiel von HTD 1 zusammengefaßt:

1. HTD Partikel banden im linearen Saccharosegradienten bei der für Retroviridae typischen Dichte von 1,16 g/ccm.
2. Bedingt durch Scherkräfte bei der Zentrifugation läßt sich eine Corefraktion bei einer Dichte von 1,24 g/ccm nachweisen.
3. Die Partikel weisen eine merkliche Stabilität gegen Detergenzbehandlung auf.
4. Deshalb konnte die RNS Natur des endogenen Templates durch Zugabe von RNase A nicht nachgewiesen werden.
5. Diese wird jedoch durch eine endogene DNS Polymerasereaktion nahegelegt, die durch Kalbsthymusprimer stimuliert und durch Actinomycin D teilweise gehemmt wird.
6. Neben der endogenen Reaktion spricht auch die positive Reaktion mit dem spezifischen exogenen Template-Primer rCmdG für eine RDDP. Meistens ist jedoch mit exogenen Template-Primern keine Enyzmaktivität nachweisbar.

IV. Test auf Infektiosität der HTD-Partikel durch Kokultivierungsexperimente

Eingehende Untersuchungen der Teratocarcinompartikel sind erschwert durch die geringe Partikelproduktion : Selbst mit Hilfe selektiver Kultivierungsmethoden wird nur ein kleiner Teil der Zellen permissiv fur die Partikelexpression. Diesem Mengenproblem ließe sich begegnen durch Übertragen der HTD Partikel auf ein geeignetes, gut produzierendes Zellsystem. Damit wäre zugleich der Nachweis ihrer Infektiosität erbracht: Teratocarcinompartikel könnten als Viren bezeichnet werden.
In den letzten Jahren gelang es wiederholt endogene Viren, deren Synthese in den Ursprungszellen für eine Isolierung und Charakterisierung zu gering war, durch die Methode der Kokultivierung auf permissive Zellen zu übertragen und dann zu identifizieren. (z.B. Benveniste et al., 1974). Da es sich bei den Teratocarcinompartikeln wegen der morphologischen Ähnlichkeit mit den in menschlicher Plazenta gefundenen Partikeln ebenfalls um endogene Viren handeln könnte, erschien die Methode der Kokultivierung geeignet, um permissive Wirtszellen, auch Indikatorzellen genannt, zu finden. Für diese Experimente wurden subkonfluente Teratocarcinomkulturen wie beschrieben induziert und die Partikelproduktion durch elektronenmikroskopische Kontrolle von Schwesterkulturen bestätigt. Anfänglich standen nur die Tera 1 und Tera 2 Monolayerkulturen zur Verfügung, später auch die spontan produzierenden Multilayerlinien, sowie die Linien GH, HL und ER. Als Indikatorzellen wurden Linien gewählt, in denen sich endogene Primatenviren gut vermehren. Sicherung der Virusfreiheit dieser Wirtslinien erfolgte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und durch Reverse Transcriptase-Tests.

Zwei Tage nach Induktion wurden nur wenige Indikatorzellen zu den Teratocarcinomkulturen gegeben, so daß beide Zelltypen möglichst 1 bis 2 Wochen ohne Subkultivierung in engem Kontakt bleiben konnten. In der Regel hatten die schnell wachsenden Indikatorzellen die Tumorzellen nach 3 bis 4 Wochen verdrängt. Dann schlossen

sich weitere Kokultivierungszyklen an, bei denen die bereits kokultivierten Indikatorzellen zu neuen, induzierten Teratocarcinomkulturen gesät wurden. Die Experimente erstreckten sich über 4 bis 8 Monate. Dieser lange Zeitraum erschien notwendig, da Todaro et al. 1978 in ähnlichen Versuchen mit endogenen Primatenviren erst nach 5 bis 7 Monaten positiven Virustransfer erzielt hatten.
Etwa alle 4 Wochen wurde durch Reverse Transcriptase Tests und mit Hilfe des Elektronenmikroskops auf Virusproduktion in den Indikatorzellen geprüft. Unter den angewandten Bedingungen erwies sich jedoch keine der eingesetzten Linien als permissiv für HTD Partikel. So bedarf es weiterer Klärung, ob fehlende Infektiosität ein Charakteristikum der Teratocarcinompartikel ist oder ob bisher keine geeigneten Indikatorzellen gefunden wurden.

Der erste Schritt zu einer erfolgreichen Infektion ist der Mechanismus der Anheftung von Viruspartikeln an und die Penetration in die Wirtszelle. Modelle zu diesem noch recht unerforschten Phänomen wurden von Helenius und Mitarbeitern für das Semliki Forest (SF) Virus, einem Togavirus, entwickelt (Simons et al., 1982). Für die Anheftung der SF Partikel an die sogenannten " coated pit " Regionen der Zellmembran, die durch die Ansammlung des Glykoproteins Clathrin gebildet werden, sind die Glykoproteine der Virushülle verantwortlich. Durch Endocytose werden die Partikel dann mit Hilfe von " coated vesicles " in Lysosome der Zellen eingeschleust. Der weitere Infektionsweg ist noch recht spekulativ.
Wie Bild 13 nahelegt, können auch HTD Partikel durch diesen Endocytosemechanismus von benachbarten Teratocarcinomzellen aufgenommen werden. Bisher gibt es jedoch keine Hinweise für eine biologische Bedeutung dieses Vorgangs.

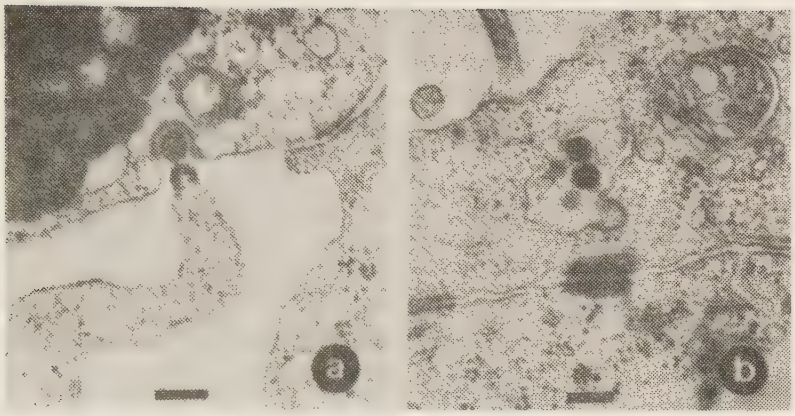


Bild 13 a) Anheftung eines HTD 3 Partikels an eine Nachbarzelle, die eine coated pit Region gebildet hat.

b) Verschmelzung eines coated vesicles mit einem größeren Vesikel (Lysosom?), in dem sich einige HTD 3 Partikel befinden.

Balken: 200 nm

Tabelle 5 faßt die Ergebnisse der Kokultivierungsexperimente zusammen (Einzelheiten siehe Material und Methoden):

Tabelle 5 Kokultivierung von Teratocarcinomlinien mit verschiedenen Indikatorlinien

Indikatorzellen	Spezies/ Histologie	Virustransmission							
		Tera 1		Tera 2		GH		HL	
		EM	RT	EM	RT	EM	RT	EM	RT
CF2TH	Hund/ Thymus	-	-	-	-	-	-	-	-
FEF	Katze/ embryonale Fibroblasten	-	-	NT	NT	-	-	-	-
C-58	Nerz/ Lunge	-	-	-	-	-	-	-	-
TB-1-LU	Fledermaus/ Lunge	-	-	-	-	-	-	NT	NT
Z-5	Ziege/ Bindegewebe	NT	NT	NT	NT	-	-	NT	NT
TEK	Tupaia/ embryonale Niere	-	-	-	-	-	-	NT	NT
HF-AVTS	Krallenaffe/ Fibroblasten	-	-	-	-	-	-	NT	NT
Vero	Meerkatze/ Niere	-	-	NT	NT	-	-	NT	NT
FL	Mensch/ Amnion	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
RD	Mensch/ Rhabdomyosarcom	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Test auf Virustransmission durch Elektronenmikroskop (EM) und Reverse Transcriptasebestimmung (RT);

NT : nicht getestet,

- : negativ

V. Überinfektion mit dem endogenen Pavianvirus BEV

Die bisher beschriebenen Besonderheiten der Teratocarcinompartikel: Abweichungen von der C-Typ Morphologie, fehlende kollabierte Cores, fehlende Infektiosität und Schwierigkeiten beim Nachweis der Reversen Transcriptase mit synthetischen Template-Primern könnten auch in der Art der Teratocarcinomzellen begründet sein.

Experimente wurden initiiert, um mögliche zelluläre Einflüsse aufzuspüren. Da die Gefahr einer ungewollten Kontamination der Teratocarcinomlinien bestand, wurden die Versuche, räumlich streng getrennt von den in dieser Arbeit beschriebenen, zum größten Teil von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, vor allem von Dr. J. Löwer und G. Kunz-Bicking durchgeführt. Elektronenmikroskopische Aspekte sind ausführlicher in der Diplomarbeit von K. Boller beschrieben. Hier sollen nur die Konzeption und die wesentlichen Ergebnisse der Experimente dargestellt werden.

Sind die Eigenschaften der HTD Partikel zellulär bedingt, so wäre die Expression eines anderen C-Typ Virus in diesen Zellen denselben Einflüssen ausgesetzt.
Als Testvirus wurde das Pavianvirus BEV gewählt, weil es
a) ein endogenes Virus ist, b) ebenfalls in embryonalen Zellen (Plazenta) entdeckt wurde und c) sich recht gut in menschlichen Zellen vermehrt. In Rhabdomyosarcomzellen (A 204 oder RD) läßt es sich durch die klassische C-Typ Morphologie im Elektronenmikroskop oder durch Reverse Transcriptaseaktivität im Templatevergleich (rAdT/dAdT $>$ 100) nachweisen.

Die Überinfektion von Teratocarcinomzellen mit BEV brachte folgende Ergebnisse:

1. BEV vermehrt sich besonders gut in Tera 2 Monolayerkulturen, die keine HTD 2 Partikel exprimieren,
2. Die Morphologie der BEV Partikel wird durch die Teratocarcinomzellen nicht beeinflußt (siehe Bild 14). In den Multilayerlinien Tera 1 - BEV und GH - BEV können Partikel mit BEV oder HTD Morphologie von ein und derselben Zelle exprimiert werden. Elektronenmikroskopische Abschätzungen zeigen, daß in den

infizierten Kulturen beide Partikelarten in etwa den gleichen Mengen vorkommen. Auch finden sich reife BEV Partikel mit den typischen kollabierten Cores.

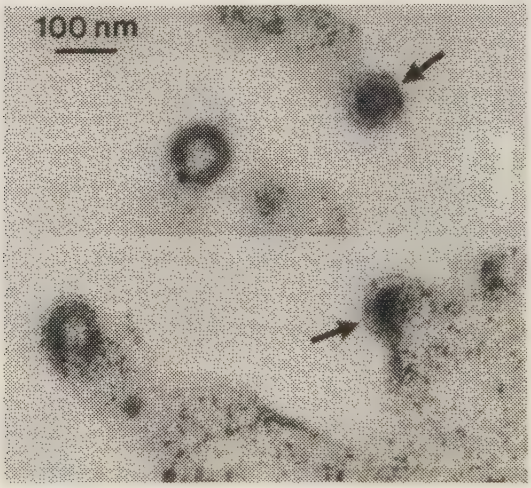


Bild 14 GH Teratocarcinomzellen überinfiziert mit BEV, Partikel mit HTD Morphologie und mit BEV Morphologie (gekennzeichnet durch den Pfeil).

oben: aus benachbarten Zellen

unten: aus derselben Zelle

3. Wie in Tabelle 6 deutlich wird, ist eine Störung des exogenen RT Tests (Templatevergleich) durch Faktoren der Wirtszelle nicht auszuschließen: Nach strengen Maßstäben läßt sich eine RDDP nur in den Tera 2 Monolayerkulturen, sowie in den Rhabdomyosarcomlinien eindeutig nachweisen, nicht jedoch in den Dom und Vesikel bildenden Linien. Neben zellulären könnten auch HTD codierte Hemmfaktoren sowie eine zu geringe Partikelproduktion als Erklärungsmöglichkeiten in Betracht kommen, obwohl letzteres nach elektronenmikroskopischen Abschätzungen wenig wahrscheinlich ist.

4. Die fehlende Infektiosität der HTD Partikel ist vermutlich nicht zellulär bedingt: Tabelle 6 zeigt, daß sich BEV aus den infizierten GH-BEV Kulturen durch Kokultivierung wieder auf geeignete Wirtszellen übertragen läßt.

Tabelle 6 Überinfektion von Teratocarcinomzellen mit BEV

Linien	Morphologie der Partikel	RT Test rAdT/ dAdT	Übertragung von BEV auf Indikator-zellen durch Kokultivierung
Tera 1	HTD	1,0	negativ
Tera 2-BEV	HTD + BEV	9,2	nicht getestet
Tera 2	-	1,0	negativ
Tera 2-BEV	BEV	435	nicht getestet
GH	HTD	0,8	negativ
GH-BEV	HTD + BEV	9,1	positiv
RD-BEV	BEV	198	positiv
A 204-BEV	BEV	150	positiv

- : keine Partikelproduktion nachweisbar

VI. Charakterisierung der Teratocarcinomzellen

A. Frage nach dem Differenzierungspotential der Zellen

Die Tatsache, daß die Produktion von HTD Partikeln auf einen Teil der Teratocarcinomzellen beschränkt ist, und die Vermutung, daß die Schwierigkeiten bei ihrem Nachweis vielleicht auf zellulären Effekten beruhen, ließ den Versuch einer weiteren Charakterisierung der Dom und Vesikel bildenden Zellen interessant erscheinen.
Erkenntnisse über die Natur, die Herkunft und das Differenzierungspotential von Teratocarcinomstammzellen kommen vor allem aus dem experimentell leicht zugänglichen Maussystem (Sherman und Solter, 1975; Martin, 1980). Das Spektrum der gut untersuchten Linien umfaßt nulli- bis pluripotente, klonale Stammzellen (embryonale Carcinomzellen) sowie deren verschiedenartige, differenzierte Abkömmlinge.

Im Gegensatz dazu sind die bisher bekannten menschlichen Teratocarcinomlinien noch wenig charakterisiert, vor allem, weil viele der bei Tieren angewandten Untersuchungsmethoden beim Menschen nicht durchführbar sind. So bleibt das Auffinden bestimmter Zellmarker und der Vergleich mit dem Maussystem. Begrenzte Differenzierung in vitro beschreiben Zeuthen et al. 1980 bei der Linie PA 1, die von Asciteszellen einer Patientin mit rezidivierendem Teratom des Ovar abstammen.

Für den Versuch, die hier beschriebenen Teratocarcinomlinien zur Differenzierung anzuregen, boten sich zwei im Maussystem erfolgreiche Wege an:

1. Differenzierung durch lokale Zelldichte
2. Differenzierung über Embryoid Bodies

1. Differenzierung durch lokale Zelldichte

Lehman et al. beschrieben 1974 die spontane Differenzierung von embryonalen Carcinomzellen der Maus: Die von einem transplantablen Tumor abgeleiteten Zellen zeigten bei Subkultivierung mit Trypsin ein sehr begrenztes Differenzierungspotential. Dagegen

traten in Langzeitkulturen ohne Subkultivierung nach 1 bis 2 Monaten organoide Strukturen wie Drüsen, Knorpelregionen, Nester mit Melanocyten oder Riesenzellen auf.
Diese Methode der Langzeitkultur ohne Subkultivierung war bei der Inkulturnahme der Tübinger Teratocarcinomlinien angewandt worden. Andere Strukturen als absterbende Fibroblasten, Dome und Vesikel sowie gelegentlich syncytiale Riesenzellen konnten jedoch nicht beobachtet werden. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Etablierung der Multilayerlinie Tera 1. Die reinen Dom und Vesikel bildenden Linien schließlich ließen sich unter solchen Kulturbedingungen nicht viel länger als einen Monat in demselben Kulturgefäß halten, dann löste sich der gesamte Zellrasen ab. Dagegen zeigte sich bei dem Versuch, die Monolayerlinie Tera 2 zur Dom- und Vesikelbildung anzuregen (Kapitel I B) , daß diese Kulturen sich mühelos bis zu einem halben Jahr in denselben Kulturgefäßen halten ließen. Dabei traten nach etwa 1 bis 2 Monaten die ersten Anzeichen einer Differenzierung auf. Wie Bild 15 demonstriert, hatten sich nach etwa 4 bis 6 Monaten eine Fülle organoider Strukturen entwickelt, die den von Lehman beschriebenen ähneln. Daneben wurden auch Dome und Vesikel gebildet.
Dies Ergebnis legt den Schluß nahe, daß in Tera 2 Monolayerkulturen Stammzellen vorhanden sein müssen, die einen ähnlichen Differenzierungsmodus exprimieren wie viele Maus EC Zellen. In den ausschließlich Dom und Vesikel bildenden Linien finden sich solche Zellen nicht. Dies wird bestätigt durch den Versuch, die Linien über Embryoid Bodies zur Differenzierung anzuregen.

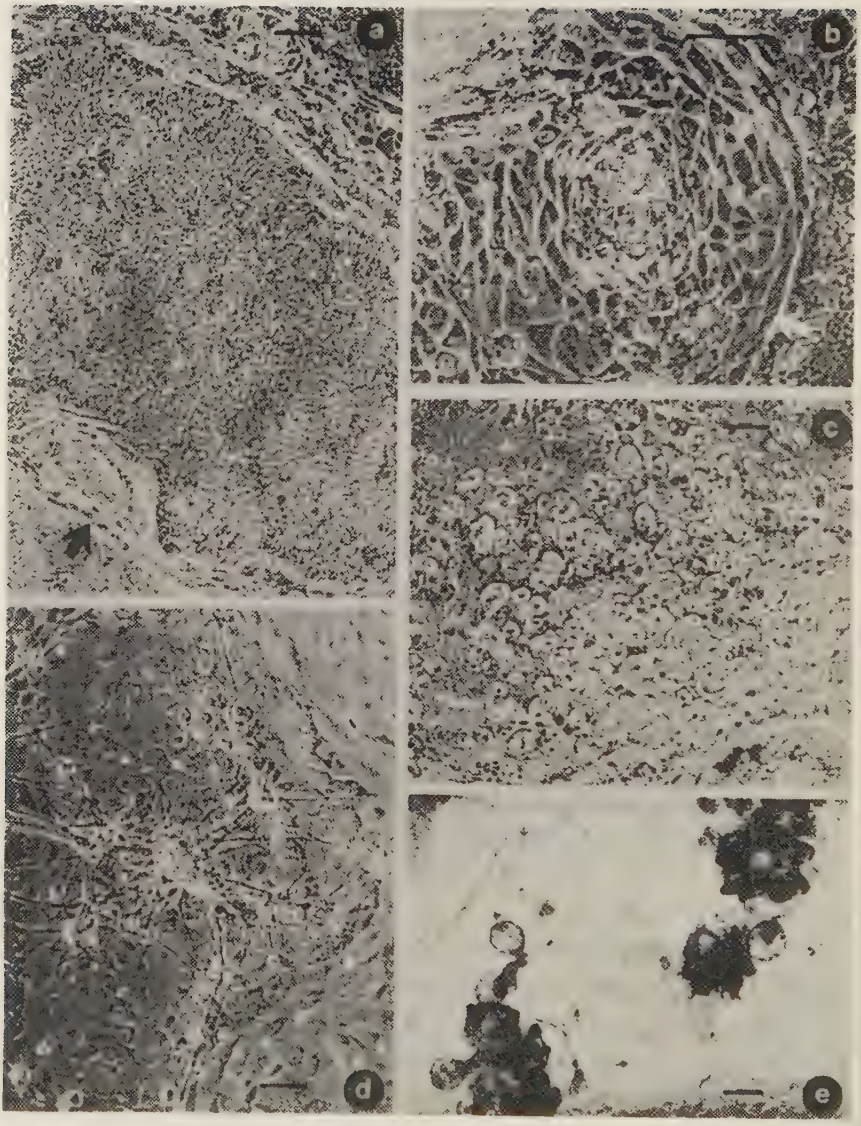


Bild 15 Differenzierung von Tera 2 Zellen durch hohe lokale Dichte (etwa 1/2 Jahr in Langzeitkultur)

a) Drüsenartige Struktur, am Rande finden sich langgestreckte glatte Muskelfasern (Pfeil)
b) Muskelfasern umgeben auch diese Struktur
c) Knorpelartige Region
d) Neuroepitheliale Region
e) Dom-und Vesikelbildung

Balken: 75 µm (a-d) und 250µm (e)

2. Versuch einer Differenzierung über Embryoid Bodies

Charakteristisch für viele pluripotente embryonale Carcinom (EC)-Linien der Maus ist ihre Eigenschaft, in Suspension zu aggregieren und in Embryoid Bodies zu differenzieren. Einfache Embryoid Bodies sind zweischichtige Strukturen mit einer äußeren Schicht aus Endoderm um einen Kern aus EC Zellen. Nach Aussaat in Gewebekulturschalen können sie in Abkömmlinge aller drei Keimblätter differenzieren (Martin und Evans, 1975). Gelegentlich entwickeln sich die kompakten Strukturen weiter in sogenannte cystische Embryoid Bodies, die neben zellulären Umstrukturierungen der EC Zellen in Endoderm und Ectoderm während der Cystenbildung auch Mesodermbildung aufweisen können (Martin et al., 1977). Da Embryoid Bodies niemals in Trophoblasten differenzieren, sind sie embryonalen Entwicklungsstadien nach der Trophoblastendetermination zu vergleichen, am ehesten wohl den Strukturen, die von 5 bis 8 Tage alten Embryoblasten während der frühen Implantationsstadien gebildet werden: Umhüllung des Embryonalknotens mit Endoderm, welches die Reichertsche Membran synthetisiert, Trennung des Embryonalknotens in embryonales und extraembryonales Ectoderm mit der Proamnionhöhle, erste Mesodermbildung (Stevens, 1975; Martin, 1980).

Die menschlichen Teratocarcinomlinien sind ebenfalls in der Lage, cystische Strukturen zu bilden, die auf den ersten Blick durchaus an Embryoid Bodies erinnern. Um dieser Ähnlichkeit weiter nachzugehen, wurden Kulturen der Linien GH, HL und der Multilayerlinien von Tera 1 und 2 trypsinisiert und in Bakterienschalen in Suspension gehalten. Die Zellen aggregierten und bildeten kompakte und cystische Strukturen (Bild 16a), die im Laufe der etwa zweimonatigen Kultivationsdauer etwas an Größe zunahmen, sich aber weiter nicht veränderten.

Wiederaussaat dieser Vesikel in Gewebekulturschalen brachte keine Anzeichen von Differenzierung: es wuchsen Zellen aus, die vollständig den Ausgangskulturen glichen (Bild 16b). Die hier untersuchten menschlichen Teratocarcinomlinien scheinen keine Strukturen zu bilden, die den Embryoid Bodies des Maussystems direkt vergleichbar sind. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Andrews et al. (1980).

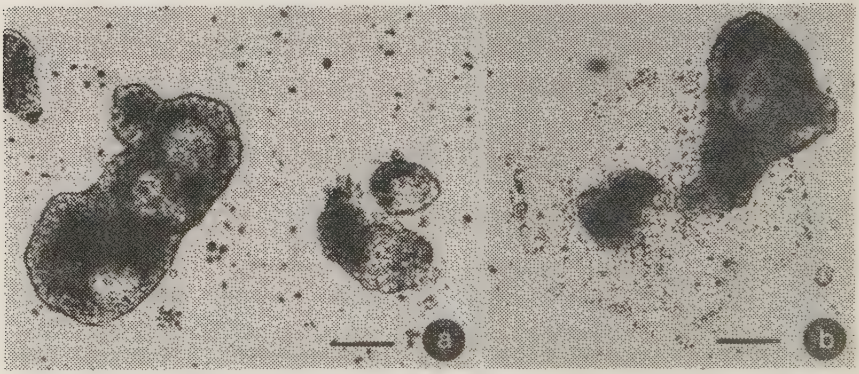


Bild 16 Versuch einer Differenzierung über Embryoid Bodies am Beispiel von GH

a) In Suspension (Bakterienschalen) werden Strukturen gebildet, die an Embryoid Bodies erinnern.

b) Nach Wiederaussaat in Gewebekulturschalen läßt sich keine Differenzierung nachweisen, die Kulturen zeigen das gleiche Wachstumsmuster wie die Ausgangskulturen.

Balken: 100µm

B. Ultrastruktur der Teratocarcinomlinien

Bei der elektronenmikroskopischen Suche nach HTD Partikeln fallen eine Reihe morphologischer Besonderheiten der Teratocarcinomzellen auf. Diese erinnern an Strukturen, die von Calarco und Brown 1969 bei Präimplantationseembryonen der Maus beschrieben wurden. In Hinblick auf die Konformität der embryonalen Entwicklung aller Mammalier vom befruchteten Ei bis zur Blastocyste erscheint ein direkter Vergleich Maus-Mensch erlaubt.

Ein Charakteristikum von unbefruchteten Eizellen und Spermien, von frühen embryonalen Entwicklungsstadien, von Trophoblasten aber auch von einigen Tumorarten (Ghadially, 1982) sind die sogenannten Annulate Lamellae (AL). Diese werden als Abkömmlinge der Kernmembran betrachtet, vor allem wegen ihrer Poren, die ähnlich wie Kernporen gestaltet sind. AL entstehen bevorzugt an Stellen, wo sich nukleäres Material an der Innenseite der Kernmembran sammelt und die Außenseite mit Ribosomen besetzt ist (Kessel, 1973). Im Cytoplasma lagern sie sich zu ringförmigen oder spiraligen Stapeln zusammen; sie können fragmentieren und mit dem endoplasmatischen Retikulum verschmelzen. Selten finden sich AL im Kern. Diese stammen von der inneren Kernmembran ab und bilden keine Stapel. Bild 17 zeigt, daß sich AL in den verschiedenen Ausprägungen in Teratocarcinomlinien nachweisen lassen. Über ihre Funktion kann bisher nur spekuliert werden. Es wird vermutet, daß AL RNS enthalten und in rasch proliferierenden Zellen - wie z.B. Blastomeren oder Trophoblasten während der Implantation - zur Speicherung genetischer Information für den Zellstoffwechsel dienen (Threadgold, 1976).

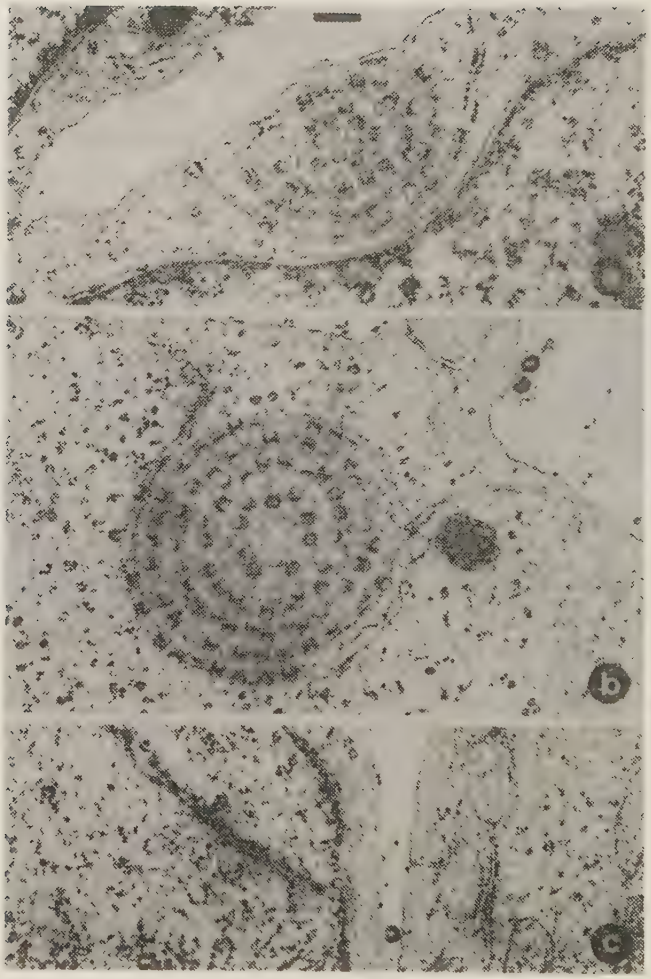


Bild 17 Annulate Lamellae in Teratocarcinomzellen

a) Bildung von Annulate Lamellae an der Außenseite der Kernmembran, Ansammlung von Kernmaterial an der Innenseite und von Ribosomen an der Außenseite der Membran (am Beispiel der Linie ER).
b) Bildung spiralförmiger Stapel und Übergang der Lamellae in rauhes endoplasmatisches Retikulum im Cytoplasma (am Beispiel der Linie HL).
c) Annulate Lamellae im Kern (am Beispiel der Linie Tera 1).

Balken : 300 nm

Als weitere Eigenart der Mausblastomere beschreiben Calarco und Brown das Auftreten großer, sphärischer, elektronendurchlässiger Vesikel gleich nach der Befruchtung. Ihr Entstehungsmodus ist unbekannt. Der Durchmesser beträgt etwa 0,6 bis 2,2 µ. Gegen das Cytoplasma sind sie nur durch eine elektronendichte Linie abgegrenzt. Ihnen wird eine Rolle bei der Bildung der Blastocystenflüssigkeit zugeschrieben.
In den menschlichen Teratocarcinomzellen, die flüssigkeitsgefüllte Dome und Vesikel bilden, finden sich ähnliche Strukturen, auch zusammen mit Annulate Lamellae (Bild 18). Diese Beobachtung kann als Indiz für den frühen embryonalen Charakter zumindest einiger Teratocarcinomzellen gewertet werden.

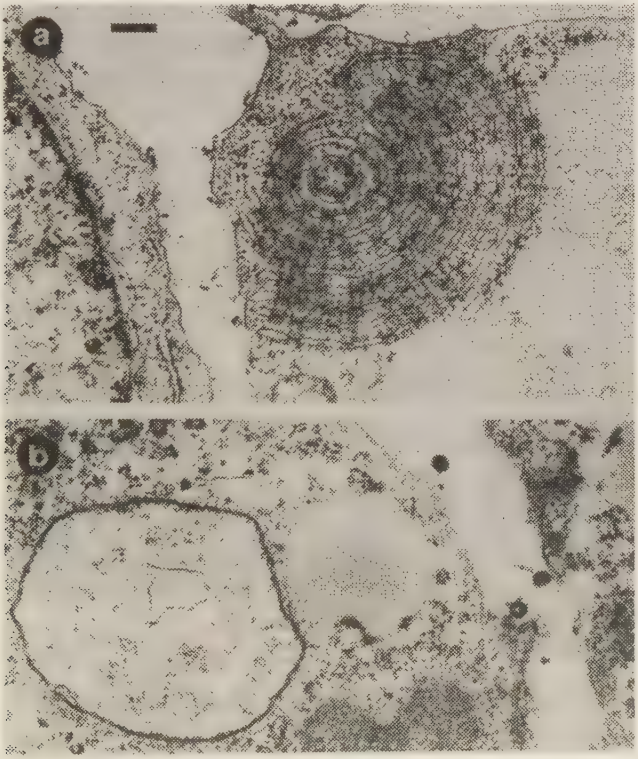


Bild 18 "Sphärische Vesikel"
a) zusammen mit Annulate Lamellae am Beispiel der Linie ER
b) zusammen mit HTD-3 Partikeln am Beispiel der Linie GH

Balken: 300 nm

Erster Differenzierungsschritt in der Embryonalentwicklung ist die Umgestaltung der äußeren Zellen der Morula zum Trophectoderm mit nachfolgender Blastocystenbildung.
Ultrastrukturell manifestiert sich die Trophoblastenentwicklung durch die Ausbildung fester, für Epithelien charakteristischer Zellkontakte, wie z.B. Verzahnung durch Mikrovilli, Desmosomen und sogenannte tight junctions. Jackson et al. untersuchten 1980 die Bildung von Desmosomen während der Trophectodermdifferenzierung in Mausembryonen. Charakteristisch für frühe Entwicklungsstadien sind die naszierenden Desmosomen, so genannt wegen ihrer geringen Größe, der unvollständigen Mittelstruktur und den kurzen Bündeln assoziierter Tonofilamente. Mit zunehmender Trophoblastendifferenzierung reifen auch die Desmosomenstrukturen aus. In den Teratocarcinomzellen lassen sich die verschiedenen Stadien der Zellkontaktausbildung finden und zwar von naszierenden Desmosomen bis zu den von Farquhar und Pallade 1963 beschriebenen komplexen Dreierstrukturen, wie sie in ausgereiften Epithelien vorkommen. Bild 19 gibt einen Überblick über diese Strukturen.

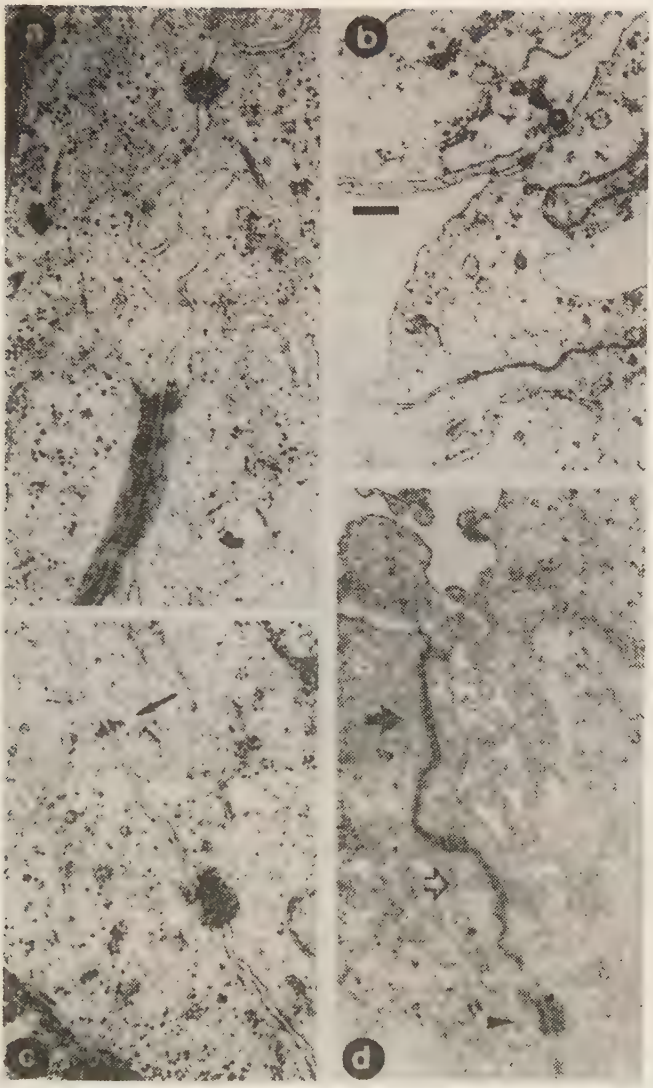


Bild 19 Ausbildung von Zellkontakten zwischen benachbarten Teratocarcinomzellen

a) Verzahnung durch Mikrovilli und Desmosomen
b) tight junction
c) naszierendes (Pfeil) und reifes Desmosom
d) Dreierkomplex, typisch für differenzierte Epithelien: tight junction unterhalb der Oberfläche (dunkler Pfeil), intermediate junction (offener Pfeil), Desmosom (Pfeilspitze).

Balken : 300 nm

Nimmt man Blastocysten in Gewebekultur, so steigt, wie Jackson et al. gezeigt haben, die Zahl der Desmosomen in den auswachsenden Trophoblasten deutlich an (1980). Die Tonofilamente sind ebenfalls stark vermehrt; sie treten häufig zu Bündeln verschiedener Dicke zusammen. Bild 20 demonstriert, daß solche Strukturen besonders häufig in frühen Kulturen der Linie HL zu finden waren.

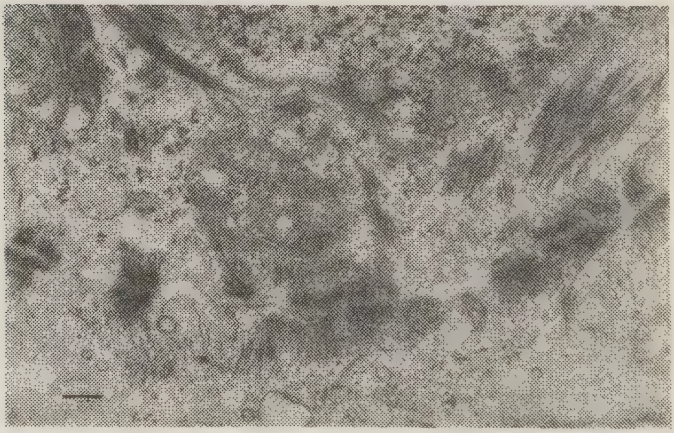


Bild 20 In frühen Kulturen der Linie HL findet sich eine Anhäufung von Desmosomen und Tonofilamenten in benachbarten Zellen.

Balken : 250 nm.

Die Beobachtungen an den Ultradünnschnitten zeigen, daß HTD Partikel sowohl von Zellen mit embryonalem Charakter, wie auch von solchen mit Merkmalen der Differenzierung produziert werden.

C. Teratocarcinomzellen produzieren Humanes Chorion Gonadotropin, ein Hormon der Plazenta

Mit der Implantation des Embryos in die Uterusschleimhaut beginnt die Plazentation, d.h. die weitere Differenzierung der Trophoblasten vor allem in Cyto- und weiter in Syncytiotrophoblasten. Zu den vielfältigen Fähigkeiten dieser Zellen gehört die Produktion des Plazentahormons Humanes Chorion Gonadotropin (HCG). Dies ist ein Protein, dessen ß-Kette leicht im Serum bestimmt werden kann, und das deshalb in der Schwangerschafts- und Tumordiagnostik (z.B. zum Erkennen von Teratocarcinomen mit Chorionanteil) eingesetzt wird.
Um die Vermutung zu stützen, daß es sich bei den Partikel produzierenden Zellen um Abkömmlinge der Trophoblastenreihe handeln könnte, wurde im Kulturüberstand der Zellen nach ß-HCG gesucht. Die Hormonbestimmung wurde freundlicherweise in der Routinediagnostik der Universitätsfrauenklinik Tübingen mit Hilfe eines kommerziellen Radioimmunoassays durchgeführt. Klinische Hormonuntersuchungen der Patienten, von denen die Tübinger Teratocarcinomlinien abstammen, hatten keine Hinweise auf einen Chorionanteil der Teratocarcinome ergeben, ebensowenig wie die pathologisch-histologische Diagnose. ß-HCG im Zellkulturüberstand würde also bedeuten, daß sich in den Tumorlinien Trophoblasten und ihre Abkömmlinge neu differenziert haben, oder daß sich einige, nicht entdeckte Trophoblasten durch in vitro Kulturbedingungen stark vermehren und ausdifferenzieren konnten.

Tabelle 7 ß-HCG Synthese von Zellkulturen

Linie	Dom- und Vesikelbildung	Partikelproduktion vor Induktion	Partikelproduktion nach Induktion	ß-HCG Synthese (mIU/ml) vor Induktion	ß-HCG Synthese (mIU/ml) nach Induktion
GH	++	+	+++	10,8	43,8
HL	+++	+	++	52,4	100,2
ER	+	+	+	2,5	32,3
Tera 1 Monolayer	-	+	++	2,7	7,0
Tera 1 Multilayer	++	NT	++	4,7	31,3
Tera 2 Monolayer	-	-	-	2,2	3,0
Tera 2 Multilayer	+	+	+	3,2	5,8
JAR	-	-	-	378,2	NT
HEF	-	-	-	4,6	4,3

Anmerkungen: Die Bewertungsgrenze für einen positiven Hormontest liegt bei 5 mIU/ml. Getestet wurde in allen Fällen drei Tage alter Kulturüberstand von konfluenten Kulturen. Normierung auf Zellzahl war nicht möglich, da die Teratocarcinomlinien Aggregate bilden.
Abkürzungen: mIU/ml: milli international units pro Milliliter, + : positiv, - : negativ, NT : nicht getestet, JAR : humane Chorioncarcinomzellen (Pätillo, 1971), HEF : primäre humane embryonale Fibroblasten.

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der ß-HCG-Bestimmungen. Untersucht wurde die spontane Hormonproduktion sowie die Produktion nach Induktion. Auffällig ist eine Korrelation mit der Fähigkeit, Dome und Vesikel zu bilden : während die Linien GH und HL spontan Hormon produzierten, ließ sich bei der Multilayerlinie von Tera 2

die noch relativ wenig Vesikel bildete, selbst nach Induktion nur eine geringe ß-HCG Synthese nachweisen.

Mit Ausnahme der Chorioncarcinomlinie JAR und der Linie Tera 1 (induziert) konnte bei keiner der Monolayerkulturen ß-HCG im Kulturüberstand gefunden werden. In den Teratocarcinomlinien GH, HL, ER und Tera 1 jedoch ist offenbar eine Population von Zellen vorhanden, die in Cyto- und Syncytiotrophoblasten differenzieren können. Bei der Linie Tera 2 lassen sich solche Stammzellen erst nach dem Zwischenschritt der Langzeitkultivierung (vergleiche Kapitel I b) in den Multilayerkulturen nachweisen.
Frühe Kulturen der Linie HL (vergleiche Trophoblastenmerkmale im Elektronenmikroskop, Abb. 19,20) zeigen eine hohe ß-HCG Produktion: 207 IU/ml in 3 Tage altem Kulturüberstand. Damit erreichten sie fast die Syntheserate der Chorioncarcinomlinie. Später sank dieser Wert, vielleicht ein Zeichen dafür, daß in der Gewebekultur die weniger differenzierten Stammzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den ausgereiften Zellen haben. Durch das Induktionsmedium scheint die Differenzierung der Trophoblastenreihe wieder angestoßen zu werden.

Die in Tabelle 7 aufgelisteten Ergebnisse legen nahe, daß die Fähigkeit der Teratocarcinomzellen, in Richtung Trophoblasten zu differenzieren, korreliert mit der Fähigkeit, HTD Partikel zu exprimieren. Linien, die spontan ß-HCG produzieren oder durch Induktion dazu angeregt werden,können, exprimieren HTD Partikel. Dabei produzieren Kulturen mit spontaner Hormonproduktion deutlich mehr Partikel, Steigerung von Partikel- und Hormonsynthese laufen parallel. Embryonale Fibroblasten als Abkömmlinge einer anderen Differenzierungsreihe, allerdings auch die Endstufen der Trophoblastenreihe, die Chorionzellen, lassen keine Partikelexpression zu, ebensowenig wie die Tera 2 Kulturen, die primär ein besonderes Differenzierungspotential zeigen (siehe VI A).

Kapitel VI läßt sich in folgenden, vorläufigen Arbeitshypothesen zusammenfassen:

1. Teratocarcinome können pluripotente Stammzellen besitzen mit der Fähigkeit,in Abkömmlinge aller drei Keimblätter zu differenzieren (Beispiel Tera 2 Monolayerkulturen).

2. Teratocarcinome besitzen Stammzellen, die als Trophoblasten determiniert sind. Trophoblastendifferenzierung kann eingeleitet werden durch bestimmte Kulturbedingungen (Dom- und Vesikelbildung) oder durch Induktion mit dem oben beschriebenen Medium.

3. Nur die Zellen aus der Trophoblastenreihe können Partikel exprimieren (Hinweise aus der Kombination von elektronenmikroskopischen und ß-HCG Daten).

D I S K U S S I O N

A. Diskussion der Zellkulturen

Teratocarcinome der Maus haben sich als geeignete Modelle erwiesen, um Probleme der Zelldetermination und -differenzierung, sowie der malignen Entartung von Zellen zu untersuchen. Angeregt durch die ermutigenden Ergebnisse aus solchen Experimenten, wurden in den letzten drei Jahren auch verstärkt menschliche Teratocarcinomlinien etabliert. Eine genauere Charakterisierung dieser Linien gestaltet sich jedoch ungleich schwieriger als im Maussystem, vor allem weil naturgemäß nur in vitro Untersuchungsmethoden anwendbar sind.

Bei der Inkulturnahme von Teratocarcinomen können theoretisch folgende Linien etabliert werden:

1. Fibroblasten aus dem Tumorstroma. Da diese Zellen primär nicht maligne sind, sollten sie nur eine begrenzte Lebensdauer aufweisen.
2. Transformierte embryonale Carcinomzellen mit unterschiedlichen in vitro Differenzierungspotentialen.
3. Differenzierte Abkömmlinge dieser Stammzellen. Nach Erfahrungen im Maussystem sollten EC Zellen ihre Malignität während der Differenzierung in Abkömmlinge aller drei Keimblätter verlieren, so daß daraus keine permanenten Zellinien zu erwarten sind und bisher beim Menschen auch nicht beschrieben wurden. Denkmöglich sind allerdings Linien aus extraembryonalen Anteilen der Tumore, z.B. aus der Trophoblastenreihe (vergleiche S. 8).

Wie in Kapitel VI dargestellt, konnten an Ultradünnschnitten aller in dieser Arbeit untersuchten, aus menschlichen Teratocarcinomen abgeleiteten Zellinien morphologische Eigenarten sehr früher embryonaler Entwicklung beobachtet werden. Das Auftreten großer, sphärischer Vesikel zusammen mit Annulate Lamellae ist charakteristisch für Blastomere bis zum Blastocystenstadium, ebenso die schrittweise Ausbildung von Interzellularverbindungen, die mit der Trophoblastendetermination in der Morula beginnt. In den Teratocarcinomlinien

wäre demnach zumindest eine Subpopulation von Zellen zu erwarten, wie sie für das Morula- und Blastocystenstadium der Embryonalentwicklung charakteristisch sind.

Die menschlichen Teratocarcinomzellen weisen jedoch auch ultrastrukturelle Merkmale differenzierter Zellen auf, die zusammen mit dem Auftreten des Plazentahormons ß-HCG auf Abkömmlinge der Trophoblastenreihe hinweisen. In vivo steigt der ß-HCG-Spiegel im Serum während des ersten Schwangerschaftsdrittels, d.h. während der Differenzierung der Trophoblasten in Cyto- und Syncytiotrophoblasten im Laufe der Plazentabildung, stark an. Bei den Teratocarcinomlinien kann ein Hormonanstieg erreicht werden durch

1. spezielle Kulturbedingungen oder
2. Inkubation mit Induktionsmedium

Folgende Untersuchungen legen nahe, daß der Hormonanstieg tatsächlich auf einer Weiterdifferenzierung von Trophoblastenvorläufern beruhen könnte:

1. Chou zeigte 1978, daß halogenierte Pyrimidine keinen Einfluß auf die Menge des von Plazentazellen produzierten ß-HCG haben. Hormonanstieg würde demnach für eine größere Anzahl neu ausgereifter Zellen sprechen.
2. Sherman und Atienza konnten 1975 nachweisen, daß bei der Kultur von Mausblastocysten die Zellen des Embryoblasten selektiv mit bestimmten Konzentrationen von halogenierten Pyrimidinen abgetötet werden können, während die Zellen des Trophectoderms überleben und sich weiterentwickeln. Zusammen mit dem Befund, daß die von den menschlichen Teratocarcinomlinien gebildeten Vesikel nicht den Embryoid Bodies der Maus entsprechen, weisen die hier angeführten Beobachtungen darauf hin, daß die Linien GH, HL, ER, Tera 1 und die Dom- und Vesikel bildende Linie von Tera 2 ein anderes Differenzierungspotential besitzen als die klassischen Maus EC-Zellen. Eher sind sie den Stammzellen von Mausblastocysten vergleichbar, deren erstes Differenzierungsprodukt ebenfalls Trophoblastenabkömmlinge sind. Allerdings bleibt abzuklären, ob die menschlichen Teratocarcinomzellen noch andere Differenzierungsmuster exprimieren können oder ob es sich um unipotente Linien handelt.

Lediglich die bereits lichtmikroskopisch unterschiedliche Monolayerlinie Tera 2 konnte bisher zu weiteren Differenzierungsschritten angeregt werden. Das bunte Bild von zellulären Strukturen (siehe Abbildung 15) laßt erwarten, daß bei eingehenderen Untersuchungen neben den durch ß-HCG Synthese charakterisierten Trophoblasten Abkömmlinge aller drei Keimblätter identifiziert werden können. In der Linie Tera 2 wäre somit eine Subpopulation omnipotenter Stammzellen zu erwarten. Denkbar ist, daß Selektion auf Dom- und Vesikelbildung zugleich Selektion auf Stammzellen mit eingeschränktem Differenzierungspotential bedeutet, z.B. auf Stammzellen, die bereits der Trophoblastendetermination unterworfen sind.
Die Tatsache, daß die Teratocarcinompartikel lediglich in einem Teil der Zellen entdeckt werden können, die sowohl embryonaler wie auch differenzierter Natur sind, legt die Vermutung nahe, daß Partikelexpression nur während der Entwicklung einer bestimmten Differenzierungsreihe - der Trophoblastenreihe? - möglich ist.

Für eine Korrelation von Partikelexpression und Trophoblastendifferenzierung sprechen neben den morphologischen Beobachtungen (siehe Kapitel VI) vor allem die ß-HCG Daten. Ein endgültiger Beweis steht jedoch noch aus. Mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie könnte versucht werden, die permissiven Zellen durch den Einsatz von Trophoblastenmarkern genauer zu kennzeichnen.

B. Diskussion der HTD Partikel

Nach morphologischen Kriterien gehören die HTD Partikel in die Reihe der C-Typ Viren (Kapitel II, Abbildung 11). Sie ähneln den von Kalter et al. (1973) beschriebenen Plazentapartikeln. Um sie als Retroviren im strengen Sinne zu klassifizieren, ist der Nachweis einer RNS als Erbmaterial sowie einer RNS abhängigen DNS Polymerase erforderlich. Auch sollten die Partikel infektiös sein.

1. Nachweis einer RNS

Die Frage nach dem genetischen Material der HTD Partikel anzugehen, war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da nicht genügend Aus-

gangsmaterial für die Isolierung von Nukleinsäuren zur Verfügung stand. Erste Hinweise auf das Vorhandensein einer RNS ergeben sich aus der endogenen Reaktion der Reversen Transcriptase (Kapitel III). Weitere Beweise könnten erbracht werden durch die Charakterisierung des Produktes der endogenen Reaktion in der Art des von Baxt und Spiegelman (1972) beschriebenen " simultaneous detection " Tests. Mit Hilfe dieser Methode kann gezeigt werden, daß an der viralen 70 S RNS ein Stück radioaktiver, komplementärer DNS (cDNS) synthetisiert wird. Dabei handelt es sich vorwiegend um sogenannte " strong stop " DNS von der Primer-Bindungsstelle (PB^-) zum 5'-Ende der RNS (Haseltine und Baltimore, 1976) (siehe Schema des Retrovirusgenoms, S. 3).
Mit Hilfe markierter cDNS könnte durch Hybridisierungsexperimente auch die Frage geklärt werden, ob es sich bei den HTD Partikeln um endogene oder exogene Viren handelt und ob sie untereinander sowie mit den Plazentapartikeln identisch sind. Voraussetzung ist allerdings die Möglichkeit für Zellkultur im Großmaßstab.

2. Nachweis einer RNS abhängigen DNS Polymerase

Kalter et al. (1973) konnten in den Plazentapartikeln keine RDDP nachweisen, ebensowenig wie Bronson et al. (1978) in den Teratocarcinompartikeln. Dagegen fanden Nelson et al. (1978) eine partikelgebundene RT Aktivität in normalen Plazenten sowie einen Inhibitor in Plazenten, in denen keine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte (1981).

Im Rahmen dieser Arbeit war bisher nur der Nachweis einer RDDP in den Monolayerkulturen der Linie Tera 1 möglich. Von den synthetischen Template-Primern reagierte nur das spezifische, RNase unempfindliche rCmdG. Überinfektionsexperimente der Teratocarcinomlinien mit dem endogenen Pavianvirus BEV lassen eine Beeinflussung der Enzymreaktion durch zelluläre oder HTD spezifische Faktoren möglich erscheinen (Kapitel V): In den aus Dom und Vesikel bildenden, spontan Partikel produzierenden Zellen abgeleiteten Linien Tera 1-BEV und GH-BEV läßt sich im Gegensatz zu der aus nicht permissiven Monolayerzellen abgeleiteten Linie Tera 2-BEV kein eindeutiger RT Nachweis durch Template-Vergleich erzielen. Allerdings sollten noch triviale Mengenprobleme

ausgeschlossen werden, auch wenn diese nach elektronenmikroskopischen Abschätzungen wenig wahrscheinlich sind.

Anders als die Erfahrungen bei Primatenviren vermuten lassen, scheinen die Teratocarcinompartikel eine besonders stabile Virushülle zu besitzen. Dafür spricht vor allem die Unempfindlichkeit des endogenen RT-Tests gegenüber Detergenzbehandlung, sonst häufig ein besonders kritischer Punkt der Reaktion (Novak et al., 1979).
Große Stabilität der Virushülle könnte auch eine weitere Erklärung (siehe Kapitel III B) bieten für die Diskrepanz, daß bei den HTD-1 Partikeln mit Gradient 1 (Figur 2, Template rCmdG) eine positive, mit Gradient 2 (Figur 3, Templatevergleich rAdT/dAdT) eine negative Raktion zu verzeichnen war, obwohl die Partikelkonzentration in beiden Tests (bezogen auf die Menge an Ausgangsmedium) in etwa gleich war: Gradient 1 wurde 2 Stunden mit 185 000 g gebandet, Gradient 2 dagegen nur 1 Stunde mit 70 000 g (siehe Material und Methoden) . Die starken Scherkräfte, die im Gradienten 1 auftraten, könnten die Partikel zum Teil zerschlagen und somit die Reaktion zwischen RT und Template ermoglicht haben. Dies wäre ein eigentlich ungewollter Vorgang, da das Enzym normalerweise erst im Test durch Detergenzbehandlung freigesetzt werden soll, um einen vorzeitigen Abbau durch Proteasen zu verhindern. Die schonenderen Zentrifugationsbedingungen für Gradient 2 waren gewählt worden, um die im Gradient 1 dokumentierte Verschiebung der Enzymaktivität zu den Dichten der viralen Cores und das gelegentliche Auftreten einer Aktivität im oberen Teil des Gradienten, das für lösliche RT spricht, zu vermeiden.
Bisher jedoch ist die Frage nicht zu entscheiden, ob die Schwierigkeiten, mit synthetischen Template-Primern eine eindeutig positive exogene RDDP Aktivität nachzuweisen, nur auf eine außergewöhnliche Stabilität der Partikel zurückzuführen ist, oder ob sie nicht doch durch besondere Eigenschaften des Enzyms hervorgerufen werden. Dieselben Überlegungen treffen auch für die vielen vorläufigen, ebenfalls negativen und hier nicht weiter beschriebenen Versuche zu, in pelletierten Kulturüberständen (40 000 g) der Linien GH und HL eine exogene RDDP Aktivität nachzuweisen. Wie die Überinfektionsergebnisse zeigen, muß in diesen Zellinien zusätzlich das Vorhandensein eines Inhibitors der Enzymreaktion in Betracht gezogen werden.

3. Nachweis einer Infektiosität der HTD-Partikel

Durch die in dieser Arbeit angewandte Methode der Cocultivierung konnte bislang keine Infektiosität der Teratocarcinompartikel nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Kalter und Bronson bei den von ihnen beschriebenen Partikeln.
Mangelnde Infektiosität ist oft gekoppelt mit genetischen Defekten. Zwar würden ausgedehnte Deletionen in den viralen Genen keine Partikelproduktion erlauben, Beispiele aus der Literatur zeigen jedoch, daß bei begrenzten Defekten sehr wohl Partikelproduktion möglich ist. Wie die positiven RT-Teste nahelegen, müßten genetische Defekte bei HTD Partikeln entweder in den gag oder den env Genen zu vermuten sein.

1980 fanden Yoshinaka et al. in Viruspräparationen von Mäuseleukämieviren neben reifen Partikeln immer einen Prozentsatz unreifer Viren, bei denen ähnlich wie bei den HTD Partikeln die Cores nicht kollabieren. Diese unreifen Strukturen banden im Saccharosegradienten bei etwa 1,19 g/ccm. Reverse Transcriptase ist nachweisbar. Es fehlt jedoch die proteolytische Aktivität, die normalerweise das virale Vorläuferprotein Pr 65^{gag} in sich ablösenden oder bereits abgelösten Partikeln schneidet und damit den Reifungsprozeß der Viren vollendet. Ob die unreifen Strukturen infektiös sind, ist unklar.In Hamsterzellen, die von einem durch ein Mäusesarkomvirus induzierten Tumor abstammen, wurden ebenfalls unreife Partikel beschrieben (Demsey et al., 1980). Diese scheinen nur aus einem Strukturprotein mit dem Molekulargewicht 70 000 zu bestehen. Virale Hüllproteine und Reverse Transcriptase waren nicht nachweisbar.

Die bisher erwähnten, defekten Partikel gehören alle in die Gruppe der exogenen Viren. Mit den sogenannten intracisternalen A Partikeln (IAP) liegt im Mäusesystem ein nicht infektiöses Agenz vor, das zu den endogenen Viren gerechnet werden kann.
Die IAP sind einer Regulation während der Embryonalentwicklung unterworfen: Sie werden vor allem in Oocyten, in Blastomeren bis zum Morulastadium und in der Plazenta exprimiert, finden sich allerdings auch in verschiedenen Tumoren (Calarco und Szollosi, 1973; Smith et al., 1975). Eine ähnliche Regulation ist für die HTD Par-

tikel zu vermuten.
IAP besitzen eine 35 bzw. 70 S RNS und RDDP Aktivität (Wong-Staal, 1975), kollabierte Cores werden nicht beschrieben. Hauptstrukturprotein ist ein Protein mit dem Molekulargewicht 73 000, das bemerkenswert stabil gegen Detergenzbehandlung ist (Wivel et al., 1973). IAP besitzen vermutlich kein vollständiges "env" Gen (Callahan et al., 1981).

Die elektronenmikroskopischen Hinweise, daß HTD Partikel durch " coated pits " in andere Teratocarcinomzellen eingeschleust werden, lassen das Vorkommen von Glykoproteinen in der Partikelhülle vermuten. Diese müssen jedoch nicht viraler Natur sein, da auch zelluläre Glykoproteine während des Buddings-Prozesses eingebaut werden können. Auch IAP wurden in phagozytischen Vesikeln gefunden, ohne daß sie zur Infektion der Zellen führten (Wivel et al, 1973). Nur eine Analyse der Strukturproteine von HTD Partikeln würde zeigen, ob ihre fehlende Infektiosität auf einem genetischen Defekt in den "env" oder "gag" Genen beruht oder ob einfach noch keine permissive Zelle gefunden wurde. Eine solche Analyse scheiterte bisher an nicht ausreichendem Ausgangsmaterial. Massenproduktion der Partikel ist auch für diese Aufgabe erforderlich.

MATERIAL UND METHODEN

Kapitel I

Geräte

Brutschrank	:	Heraeus, Hanau
Gewebekulturschalen und -flaschen	:	Falcon, LS Labor Service, München
Mikroskop, Diavert mit Photoaufsatz	:	Leitz, Wetzlar

Medien

Physiologische Kochsalzlösung, (0,9% NaCl in Aqua bidest.)	:	Merck, Darmstadt
Dulbeccos Minimal Essential Medium (Dulbecco und Freeman, 1959)	:	Lösungslabor des Max-Planck-Instituts für Virusforschung, Tübingen
Fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert (56°C, 30 min)	:	Seromed, LS Labor Service, München
Glutamin (200 mM)	:	"
Tryptosephosphatbouillon	:	"

Trypsin-EDTA (0,125%, pH 7,4)
Rezept für 5 Liter:

NaCl	40,0	g	:	Merck, Darmstadt
KCl	1,0	g	:	"
KH_2PO_4	1,0	g	:	"
Na_2HPO_4	5,75	g	:	"
Trypsin	6,25	g	:	"
EDTA-Dinatriumsalz	1,0	g	:	"
Streptomycin	0,5	g	:	Heyl, Berlin
Penicillin	500 000	E	:	Höchst, Frankfurt

Standardmethode zum Passagieren von Zellkulturen

Nach Absaugen des verbrauchten Kulturmediums wurde der Zellrasen durch Zugabe von wenigen Millilitern Trypsin-EDTA-Lösung vom Plastik der Gewebekulturgefäße gelöst. Wiederaussaat der Zellen erfolgte 1:5 verdünnt mit frischem Kulturmedium in neue Gewebekulturgefäße.

Kapitel II

Gerate:

Elektronenmikroskop, Elmiskop Ia und 102 : Siemens, München

Lösungen und Medien:

Induktionsmedium I, Kulturmedium angereichert mit:

Joddesoxyuridin (IDU)	20 µg/ml	:	Sigma, München
Dexamethason	10^{-6} M	:	"
Dimethylsulfoxyd	1 %	:	Merck, Damrstadt

Induktionsmedium II, wie Induktionsmedium I ohne IDU

PBS Lösung (pH 7,4), Rezept für 5 Liter:

NaCl	50,0 g	:	Merck, Darmstadt
KCl	1,25 g	:	"
Na_2HPO_4	7,19 g	:	"
KH_2PO_4	1,25 g	:	"

Glutaraldehyd, über Aktivkohle gereinigt (25%) : "

Induktion von Zellkulturen:

Subkonfluente Zellkulturen wurden 24 Stunden lang mit Medium I im Dunklen inkubiert, dann mit Medium II gewaschen und bis zum Ende

des Experimentes in Medium II gehalten.

Vorbereitung der Kulturen für die Elektronenmikroskopie:

Die Fixierung der Zellkulturen erfolgte bei Zimmertemperatur durch Zugabe von Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5%). Einige Stunden später wurden die Überstände abgesaugt und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung in PBS-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Von Mitarbeitern der elektronenmikroskopischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Virusforschung, Tübingen, Leiter Dr. H. Frank, wurden folgende Arbeiten ausgeführt: Einbetten der Präparate in Epon, Herstellung und Kontrastierung der Ultradünnschnitte.

Die Photos wurden ebenfalls von Mitarbeitern dieser Abteilung entwickelt.

Kapitel III

Geräte:

Corning Rollerflaschen (490 cm^2)	:	Aqualab, Tübingen
Rollerschrank, Eigenbaumodell	:	Werkstatt des Friedrich Miescher Labors, Tübingen
Zentrifuge RC 2-B (Rotor: GSA)	:	Sorvall, Bad Nauheim
Ultrazentrifuge Spinco L2 65B (Rotoren: Typ 21, 50 Ti)	:	Beckmann, München
Ultrazentrifuge OTD-2 (Vertikalrotor: TV 850)	:	Sorvall, Bad Nauheim
Fraktionssammler Ultrorac 7000	:	LKB, München
Abbé - Refraktometer	:	Zeiss, Oberkochen
Teströhrchen	:	Greiner, Nürtingen
Zwölffach-Filtrationsgerät	:	Millipore, Neu-Isenburg
Nitrozellulosefilter	:	Sartorius, Göttingen
Liquid Scintillation Counter (Modell 26607)	:	Packard, Frankfurt

Lösungen:

Saccharose	:	Merck, Darmstadt
TN Puffer (pH 8,3): 0,01 M Tris	:	"
0,1 M NaCl	:	"
TNE Puffer (pH 8,3): 0,01 M Tris	:	"
0,15 M NaCl	:	"
0,01 M EDTA	:	"
Detergenz Nonidet P-40 (NP40)	:	Shell, London
Salze für die Ionentitration ($MnCl_2$ und $MgCl_2$)	:	Merck, Darmstadt
Stop Mix für RT Teste: 10% Trichloressigsäure mit 0,01 M $Na_4P_2O_7$	:	"

Reaktionsmischung für exogene RT-Teste (Endkonzentration) :

Basalmedium (pH 8,3) :

0,05 M Tris-HCl	:	Merck, Darmstadt
0,08 M KCl	:	"
0,001 M Dithiotreit	:	Boehringer, Mannheim

Energie regenerierendes System:

0,1 mM ATP	:	"
0,012 mM Phosphoenolpyruvat	:	"
0,1 mg/ml Pyruvatkinase	:	"

Zweiwertige Ionen:

0,5 mM $MnCl_2$	:	Merck, Darmstadt

Synthetische Template-Primer:

5 µg/ml $(rCm)_n \cdot (dG)_{12-18}$	:	Boehringer, Mannheim
bzw. 5 µm/ml $(rA)_n \cdot (dT)_{12-18}$	:	"
bzw. 5 µg/ml $(dA)_n \cdot (dT)_{12-18}$	:	"

Nukleotide:

0,1 mM dCTP und 0,05 mM dGTP	:	"
bzw. 0,1 mM dATP und 0,05 mM dTTP	:	"

Radioaktivität:

0,12 mCi/ml (^3H) dGTP (15Ci/mM)	:	Schwarz/Mann, Heidelberg
bzw. 0,12 mCi/ml (^3H) dTTP (50Ci/mM)	:	"

Volumen pro Testansatz: 100 µl

Reaktionsmischung für endogene
RT Teste(Endkonzentration):

Basalmedium:

unverändert

Energie regenerierendes System:

unverändert:

Zweiwertige Ionen:

unverändert

Nukleotide:

0,2 mM dATP	:	Boehringer, Mannheim
0,2 mM dCTP	:	"
0,2 mM dGTP	:	"
0,016 mM dTTP	:	"

Radioaktivität:

0,2 mCi/ml (^{3}H) dTTP (50Ci/mM)	:	Schwarz/Mann, Heidelberg

Je nach Fragestellung:

0,1 mg/ml RNase A	:	Boehringer, Mannheim
0,1 mg/ml Actinomycin D	:	"
0,01mg/ml Kalbsthymus-DNS-Primer	:	Dr. R. Jänisch, Hamburg

Volumen pro Testansatz: 100 µl

Anreicherung und Reinigung der HTD Partikel:

Von 20 Rollerflaschen mit konfluenten, induzierten Tera 1 Monolayerkulturen (Passage 90 bis 100) wurde sechsmal hintereinander im Abstand von vier Stunden Kulturüberstand gesammelt. Nach Abzentrifugieren der Zellbruchstücke (10 Minuten bei 2600x g, 4°C und 10 Minuten bei 10500 x g, 4°C) wurden die HTD Partikel in der Ultrazentrifuge sedimentiert (90 Minuten bei 40000 x g, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in TN Puffer resuspendiert. Diese Partikelsuspension wurde entweder direkt im RT Test eingesetzt oder im Dichtegradienten weiter konzentriert.

Banden der HTD Partikel im linearen Dichtegradienten:

Die Partikelsuspension wurde auf einen 20-55% Saccharosegradienten (w/w in TNE Puffer) aufgetragen und im Vertikalrotor zentrifugiert:

Gradient 1 (Figur 3) : 2 Stunden bei 185000 x g, 4°C
Gradient 2 (Figur 4) : 1 Stunde bei 70000 x g, 4°C.
Fraktionierung der Gradienten erfolgte in 12 bzw. 24 Fraktionen, deren Dichte im Refraktometer bestimmt wurde.
Die einzelnen Fraktionen wurden dann noch einmal sedimentiert (30 Minuten bei 60000 x g, 4°C) und in TN Puffer resuspendiert.

Exogener Reverse Transcriptase Test, Ionentitration:

Das Aufbrechen der HTD Partikel erfolgte durch Inkubation des Pellets mit 0,2% Detergenz (Endkonzentration) 15 Minuten lang im Eisbad. In 100 µl Reaktionsgemisch wurde die Enzymaktivität von je 20 µl dieser Partikelsuspension bei den in Figur 2 angegebenen Ionenkonzentrationen von $MnCL_2$ und $MgCl_2$ getestet. Dazu wurde das Reaktionsgemisch 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stop Mix beendet (10 Minuten im Eisbad). Das Präzipitat wurde auf Nitrozellulosefiltern gesammelt und die radioaktiven Zerfälle im Liquid Scintillation Counter bestimmt.

Exogene RT Aktivität in den Fraktionen der Dichtegradienten:

Bei diesen Tests wurde immer das gesamte Material der einzelnen Fraktionen im Test eingesetzt. Die Detergenzkonzentration zum Aufbrechen der HTD Partikel betrug 0,1 %. Das Reaktionsgemisch enthielt die optimale Konzentration an zweiwertigen Ionen. Im Ablauf der Reaktion wurden keine Änderungen vorgenommen.

Endogener Reverse Transcriptase Test:

Pro Teströhrchen wurden 30 µl einer mit 0,1% NP40 vorinkubierten Partikelsuspension eingesetzt. Je nach Fragestellung waren in dem 100 µl Reaktionsgemisch RNase, Actinomycin D oder Kalbsthymus-primer enthalten (Tabelle 4).

Kapitel IV und VI

Zellinien:

Cf2Th	:	American Type Culture Collection
TblLU	:	"
Vero	:	"
FL	:	"
RD	:	"
FEF	:	Dr. M. Essex, Boston
C-58	:	Dr. R. Gallo, Bethesda
TEK	:	Dr. G. Darai, Heidelberg
HF AVTS	:	"
Z-5	:	Dr. R. Kurth, Tübingen
JAR	:	Dr. R. Patillo, Milwaukee
HEF	:	R. Löwer, Tübingen

Zellkulturen:

Die Zellinien wurden in Dulbeccos Minimal Essential Medium, das mit 5 bis 10% FKS und 1% Glutamin angereichert worden war, gehalten und nach der Standardmethode passagiert.

Elektronenmikroskopie:

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden wieder in Zusammenarbeit mit der Abteilung von Dr. H. Frank durchgeführt. Studentische Hilfskräfte halfen zeitweilig bei der Auswertung der großen Anzahl von Ultradünnschnitten, die vor allem bei den Kokultivierungsexperimenten anfielen.

Kulturen, in denen nach mindestens zweistündiger, intensiver Suche in drei verschiedenen Proben mit ausreichender Zellzahl (60 Zellen pro Netz) kein HTD Partikel gefunden werden konnte, wurden als negativ eingestuft.

Reverse Transcriptase Teste:

Je 30 ml Kulturüberstand der einzelnen Zellinien wurden wie für HTD Partikel beschrieben sedimentiert. Das Pellet wurde mit dem Templatevergleich rAdT/dAdT auf RT Aktivität getestet (Testbedingungen wie oben beschrieben).

Bestimmung des Humanen Chorion Gonadotropin:

Die Hormonbestimmungen wurden von Mitarbeitern des Diagnoselabors der Universitätsfrauenklinik, Tübingen, mit dem HCG-ß Radioimmunoassay (Code 1334) von Serono, Freiburg, durchgeführt.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1978, zu Beginn dieser Arbeit, gab es als einzigen, sicheren Hinweis auf die Existenz menschlicher Retroviren nur die elektronenmikroskopischen Beobachtungen von C-Typ ähnlichen Partikeln in normalen Plazenten. Leider erwies es sich als unmöglich, aus Plazenten permanente Zellinien zur weiteren Charakterisierung dieser Partikel anzuzüchten. Deshalb wurde - ausgehend von der Überlegung, daß Abkömmlinge der Trophoblastenreihe auch durch Differenzierung von Teratocarcinomstammzellen gebildet werden - Operationsmaterial von Patienten mit derartigen Hodentumoren in Gewebekultur genommen.

Drei neue Teratocarcinomlinien konnten etabliert werden. Ein Teil der Zellen in diesen drei Linien exprimierte spontan Partikel mit C-Typ ähnlicher Struktur, allerdings in sehr geringer Anzahl. Zwei amerikanische Teratocarcinomlinien konnten ebenfalls dazu angeregt werden, Partikel zu produzieren, entweder durch Chemikalien, die die Genregulation beeinflussen, oder durch eine besondere Kultivierungsmethode, die die Tumorzellen offenbar in eine bestimmte Differenzierungsrichtung lenkt. Morphologische Hinweise und der Nachweis eines spezifischen Schwangerschaftshormons (ß-HCG) legen die Vermutung nahe, daß es sich bei den permissiven Zellen um frühe Entwicklungsstadien der Trophoblastenreihe handelt.

Die Partikel-als Human Teratocarcinoma-derived Particles HTD 1-5 bezeichnet- weisen einige morphologische Besonderheiten auf (Fehlen eines elektronenhellen Zwischenraums zwischen Virushülle und -core, Fehlen von kollabierten Cores), die sie von animalischen Retroviren unterscheiden, die sie aber mit den Plazentapartikeln gemeinsam haben. HTD Partikel besitzen eine RNS abhängige DNS Polymerase, die in einer endogenen Reaktion nachweisbar ist, Hinweis auch auf die RNS Natur des Genoms. Es wird diskutiert, daß die Schwierigkeiten, die immer wieder beim Nachweis der Polymerase mit exogenen Template-Primern sowie beim Nachweis der RNase Sensitivität des endogenen Templates auftreten, in einer besonderen Stabilität der Partikelhülle begründet sind. Auch wird

ein zell- oder viruscodierter Inhibitor vermutet. Durch Kokultivierungsexperimente konnte bisher noch keine permissive Zellinie gefunden werden, in der sich HTD Partikel vermehren, so daß die Frage nach ihrer möglichen Infektiosität noch offen bleibt.

Mit den HTD Partikeln ist eine neue Gruppe von Viren gefunden worden, die zwar noch weiterer Charakterisierung bedarf, von der aber schon jetzt gesagt werden kann, daß sie sich in morphologischer, biochemischer und biologischer Hinsicht von animalen Retroviren unterscheidet. Die Ähnlichkeit der HTD Partikel mit den Plazentapartikeln legt nahe, daß es sich dabei um endogene menschliche C-Typ Viren handelt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Aaronson, S.A. und Stephenson, J.R. (1976). Endogeneous type-C RNA viruses of mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta 458, 323 - 354.

Andrews, P.W., Bronson, D.L., Benham, F., Strickland, S. und Knowles, B.B. (1980). A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. Int. J. Cancer 26, 269 - 280.

Baltimore, D. (1970). Viral RNA-dependant DNA polymerase. Nature 226, 1209 - 1211.

Baltimore, D. und Smoler, D. (1971). Primer requirement and template specificity of the DNA polymerase of RNA tumor viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1507 - 1511.

Baxt, W.G. und Spiegelman, S. (1972). Nuclear DNA-sequences present in human leukemic cells and absent in normal leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3737 - 3741.

Benveniste, R.E., Lieber, M.M., Livingston, D.M., Sherr, C.J., Todaro, G.J. und Kalter, S.S. (1974). Infectious C-type virus isolated from a baboon placenta. Nature 248, 17 - 20.

Bernhard, W. (1960). The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. Cancer Res. 20, 712 - 727.

Bernhard, W., Oberling, C. und Vigier, P. (1956). Ultrastructure de virus dans le sarcome de Rous, leur rapport avec le cytoplasme des cellules tumorales. Bull. Cancer 43, 407 - 422.

Bishop, J.M. und Varmus, H. (1982). Function and origin of retroviral transforming genes, in: RNA Tumor Viruses (Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. und Coffin, J. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, 999 - 1108.

Boller, K. (1981). Elektronenmikroskopische Untersuchung Oncovirusartiger Partikel aus menschlichen Teratokarzinom-Zellkulturen. Diplomarbeit, Tübingen.

Bronson, D.L., Ritzi, D.M., Fraley, E.E. und Dalton, A.J. (1978). Morphologic evidence for retrovirus production by epithelial cells derived from a human testicular tumor metastasis. J. Natl. Cancer Inst. 60, 1305 - 1308.

Bronson, D.L., Fraley, E.E., Fogh, J. und Kalter, S.S. (1979). Induction of retrovirus particles in human testicular tumor (Tera-1) cell cultures: An electron microscopic study. J. Natl. Cancer Inst. 63, 337 - 339.

Calarco, P.G. und Brown, E.H. (1969). An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. J. Exp. Zool. 171, 253 - 284.

Calarco, P.G. und Szollosi, D. (1973). Intracisternal A particles in ova and preimplantation stages of the mouse. Nature New.Biol. 243, 91 - 93.

Callahan, R., Kuff, E.L., Lueders, K.K. und Birkenmeier, E. (1981). Genetic relationship between the Mus cervicolor M 432 retrovirus and the Mus musculus intracisternal Type A particle. J. Virol. 40, 901 - 911.

Chou, J.Y. (1978). Establishment of clonal human placental cells synthesizing human choriogonadotropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1854 - 1858.

Coffin, J. (1982). Structure of the retroviral genome, in: RNA Tumor Viruses (Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. und Coffin, J. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, 261 - 368.

Coffin, J. (1982a).Endogenous viruses, in: RNA Tumor Viruses (Weiss,R., Teich,N., Varmus,H. und Coffin, J. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, 1109 - 1204.

Colletta, G., Fragomele, F., Sandomenico, M.L. und Vecchio, G. (1979). Enhanced expression of viral polypeptides and messenger RNA in dimethylsulfoxid and bromodeoxyuridine - treated Friend Erythroleucemic cells. Exp. Cell Res. 119, 253 - 264.

Crawford, L.V. und Crawford, E.M. (1961). The properties of Rous sarcoma virus purified by density gradient centrifugation. Virology, 13 , 227 - 232.

Dalton, A.J., Hellman A., Kalter, S.S. und Helmke, R.J. (1974). Ultrastructural comparison of placental virus with several type-C oncogenic viruses. J. Natl. Cancer Inst. 52, 1379 - 1381.

Demsey, A., Collins, F. und Kawka, D. (1980). Structure of and alteration to defective murine sarcoma virus particles lacking envelope proteins and polyprotein cleavage. J. Virol. 36, 872 - 877.

Dickson, C., Eisenman, R., Fan, H., Hunter, E. und Teich, N. (1982). Protein biosynthesis and assembly, in: RNA Tumor Viruses (Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. und Coffin, J. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, 513 - 648.

Dirksen, E.R. und Lewy, J.A. (1977). Virus-like particles in placentas from normal individuals and patients with systemic Lupus Erythematosus. J. Natl. Cancer Inst. 59, 1188 - 1192.

Dixon, F.J., Jr., und Moore, R.A. (1953). Testicular tumors - A clinicopathologic study. Cancer 6, 427 - 454.

Dulbecco, R. und Freeman, G. (1959). Plaque production by the Polyoma virus. Virology 8, 396 - 397.

Ellermann, V. und Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. Zentralbl. Bakteriol. (Orig. A) 46, 595 - 609.

Farquhar, M.G. und Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia.J.CellBiology 17, 375 - 412.

Fine, D. und Schochetman, G. (1978). Type D primate retroviruses. A review. Cancer Res, 38, 3123 - 3139.

Fogh, J. (1971). Cultivation, characterization and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis and bladder tumors. Natl. Cancer Inst. Monogr. 49, 5 - 9.

Fogh, J. und Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines, in: Human tumor cells in vitro (Fogh, J. ed.). Plenum Press New York, 115 - 159.

Frank, H., Schwarz, H., Graf, T. und Schäfer, W. (1978). Properties of mouse leukemia viruses XV. Electron microscopic studies on the organization of Friend leukemia viruses and other mammalian C-type viruses. Z. Naturforsch. 33 c, 124 - 138.

Fridlender, B., Fry, M., Bolden, A. und Weissbach, A. (1972). A new synthetic RNA-dependant DNA polymerase from human tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 452 - 455.

Gaylord, W.H., Jr. (1955). Virus-like particles associated with the Rous sarcoma as seen in sections of the tumor. Cancer Res. 15, 80- 83.

Gerard, F.G., Rottman, F. und Green, M. (1974). Poly (2'-O-methyl-cytidylate).Oligodeoxyguanylate as a template for the ribonucleic acid directed deoxyribonucleic acid polymerase in ribonucleic acid tumor virus particles and a specific probe for the ribonucleic acid directed enzyme in transformed murine cells. Biochemistry 13, 1632 - 1641.

Gerwin, B.I., Todaro, G.J., Zeve, V., Scolnick, E.M. und Aaronson, S.A. (1970). Separation of RNA dependant polymerase activity from the murine leukaemia virion. Nature 228, 435 - 438.

Ghadially, F.N. (1982). Ultrastructural pathology of cell and matrix. Butterworths, 2nd ed., London 423 - 434.

Goodman, N.C. und Spiegelman, S. (1971). Distinguishing Reverse Transcriptase of a RNA tumor virus from other known DNA polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2203 - 2206.

Gross, L. (1958). Attempt to recover filterable agent from X-ray induced leukemia. Acta Haematol. 19, 353 - 361.

Haseltine, W.A. und Baltimore, D. (1976). In vitro replication of RNA tumor viruses. ICN - UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 4, 175 - 213.

Hooks, J.J., Gibbs, C.J., Jr., Cutchins, E.C., Rogers, N.G., Lampert, P. und Gajdusek, D.C. (1972). Characterization and distribution of two new foamy viruses isolated from chimpanzees. Arch. Gesamte Virusforsch. 38, 38 - 55.

Jackson, B.W., Grund, C., Schmid, E., Bürki, K., Franke, W.W. und Illmensee, K. (1980). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Differentiation 17, 161 - 179.

Kalter, S.S., Heberling, R.L., Helmke, R.L., Panigel, M., Smith, G.C., Kraemer, D.C., Hellman, A., Fowler, A.K. und Strickland, J.E. (1973). A comparative study on the presence of C-type viral particles in placentas from primates and other animals. Comparative Leukemia Research, 391 - 401.

Kalter, S.S., Helmke, R.L., Heberling, R.L., Panigel, M., Fowler, A.K., Strickland, J.E. und Hellman, A. (1973a). C-type particles in normal human placentas. J. Natl. Cancer Inst. 50, 1081 - 1084.

Kessel, R.G. (1973). Structure and function of the nuclear envelope and related cytomembranes. Progress in Surface and Membrane Science 6, 243 - 329.

Kurth, R., Teich, N.M., Weiss,R. und Oliver, R.T.D. (1977) Natural human antibodies reactive with primate type-C viral antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1237 - 1241.

Lasfargues, E.Y. (1975). New approaches of the cultivation of human breast carcinomas, in: Human tumor cells in vitro (Fogh, J. ed.). Plenum Press New York, 51 - 77.

Lehman, J.M., Speers, W.C., Schwartzendruber, D.E. und Pierce, G.B, (1974). Neoplastic differentiation: Characteristics of cell lines derived from a murine teratocarcinoma. J. Cell. Physiol. 84, 13 - 28.

Löwer, J., Davidson, E.A., Teich, N.M., Weiss, R.A., Joseph, A.P., und Kurth, R. (1981). Heterophil human antibodies recognize oncovirus envelope antigens : epidemiological parameters and immunological specificity of the reaction. Virology 109, 409 - 417.

Lowy , D.R., Rowe, W.P., Teich, N. und Hartley, J.W. (1971). Murine leukemia virus: High frequency activation in vitro by 5- iododeoxyuridine and 5' -bromodeoxyuridine. Science 174, 155 - 156.

Martin, G. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. Science 209, 768 - 776.

Martin, G.R. und Evans, M.J. (1974). The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivates in tissue culture. Cell 2 , 163 - 172.

Martin, G.J. und Evans, M.J. (1975). Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. Cell 6, 467 - 474.

Martin, G.J., Wiley, L.M. und Damjanow, J. (1977). The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. Develop. Biol. 61, 230 - 244.

Matthews, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses. Intervirol. 17, 1 - 199.

Nelson, J.A., Leong, J.C. und Levy, J.A. (1978). Normal human placentas contain RNA-directed DNA polymerase activity like that in viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 6263 - 6267.

Nelson, J.A., Levy, J.A. und Leong, J.C.(1981). Human placentas contain a specific inhibitor of RNA-directed DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1670 - 1674.

Novak, U., Friedrich, R. und Moelling, K. (1979). Elongation of DNA complementary to the 5' end of the Avian Sarcoma Virus genome by the virion-associated RNA dependant DNA polymerase. J. Virol. 30, 438 - 452.

Patillo, R.A., Ruckert, A., Hussa, R., Bernstein, R. und Delfs, E. (1971). The Jar cell line-continuous human multihormon production and controls. In vitro 6, 398 - 399.

Pierce, G.B. (1975). Teratocarcinoma: Introduction and perspectives, in: Teratomas and differentiation (Sherman, M.J. und Solter, D. eds.). Academic Press New York, 3 - 12.

Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. und Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C-retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7415 - 7419.

Robert - Guroff, M., Schrecker, A.W., Brinkman, B.J. und Gallo, R.C. (1977). DNA polymerase γ of human lymphoblasts. Biochemistry 16, 2866 - 2873.

Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J. Exp. Med. 13, 397 - 411.

Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M. und Gallo, R.C. (1978). DNA Polymerases of normal and neoplastic mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta 516, 419 - 487.

Schidlovsky, G. (1977). Structure of RNA Tumor Viruses, in: Recent advances in cancer research: cell biology, molecular biology and tumor biology. Volume I. (Gallo, R.C. ed.). CRC Press, Cleveland, 189 - 245.

Scolnick, E.M., Young, H.A. und Parks, W.P. (1976). Biochemical and physiological mechanisms in glucocorticoid hormon induction of Mouse Mammary tumor Virus . Virology 69, 148 - 156.

Sherman, M.J. und Atienza, S.B. (1975). Effects of bromodeoxyuridine, cytosine arabinoside and colcemid upon in vitro development of mouse blastocysts. J. Embryol. exp. Morph. 34, 467 - 484.

Sherman, M.J. und Solter, D. (eds.)(1975). Teratomas and Differentiation. Academic Press New York.

Simons, K., Garoff, H. und Helenius, A. (1982). How an animal virus gets into and out of its host cell. Scientific american 246, 46 - 54.

Smith, G.C., Kalter, S.S., Helmke, R.J., Heberling, R.L., Panigel, M. und Kraemer, D.C. (1975). A-type particles in placentas of four mouse strains (38719). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 1212 - 1216.

Stehelin, D., Varmus,H.E., Bishop, J.M. und Vogt, P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 260, 170 - 173.

Stevens, L.C. (1975). Comparative development of normal and parthenogenetic mouse embryos, early testicular and ovarian teratomas, and embryoid bodies, in: Teratomas and differentiation (Sherman, M.J. und Solter, D., eds.). Academic Press New York, 17 - 32.

Teich, N. (1982). Taxonomy of retroviruses, in: RNA Tumor Viruses (Weiss, R., Teich, N., Varmus,H. und Coffin, J. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, 25 - 207.

Teich, N., Lowy, D.R., Hartley, J.W. und Wallace, P.R. (1973). Studies of the mechanism of induction of infectious murine leukemia virus from AKR mouse embryo cell lines by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. Virology, 51, 163 - 173.

Temin, H.M. und Mizutani, S. (1970). RNA-dependant DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. Nature 226, 1211 - 1213.

Threadgold, L.T. (1976). The ultrastructure of the animal cell. Pergamon Press, 2nd ed. Oxford, 129 - 130, 293.

Todaro, G.J., Benveniste, R.E., Sherwin, S.A. und Sherr, C.J. (1978). Mac - 1, a new genetically transmitted type-C virus of primates: " Low frequency" activation from stumptail monkey cell cultures. Cell 13, 775 - 782.

Varmus , H. und Swanstrom, R. (1982). Replication of retroviruses, in: RNA Tumor Viruses (Weiss, R., Teich, N., Varmus , H. und Coffin, J. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, 369 - 512.

Verma, J.M. (1977). The Reverse Transcriptase. Biochim. Biophys. Acta 473, 1 - 38.

Vogt, P.K. (1983). Onkogene, in: Fortschrittsberichte aus Naturwissenschaft und Medizin, Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 235 - 247.

Weiss, R. (1982). The search for human RNA tumor viruses, in: RNA Tumor Viruses (Weiss, R., Teich, N., Varmus , H. und Coffin, J. eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, 1205 - 1281.

Wivel, N.A,, Lueders, K.K. und Kuff, E.L. (1973). Structural organization of murine intracisternal A particles. J. Virol. 11, 329 - 334.

Wong-Staal, F., Reitz, M.S.,Jr., Trainor, C.D. und Gallo , R.C. (1975). Murine intracisternal Type A particles: a biochemical characterization. J. Virol. 16, 887 - 896.

Yoshinaka, Y., Ishigame, K., Ohno, T., Kagejama, S., Shibata, K. und Luftig, R.B. (1980). Preparations enriched for'immature' murine leukemia virus particles that remain in tissue culture fluids are deficient in Pr 65^{gag} proteolytic activity. Virology 100, 130- 140.

Zeuthen, J., Nørgaard, J.O.R., Avner, P., Fellous, M., Wartiovaara, J., Vaheri, A., Rosen, A. und Giovanella, B.C. (1980).Charac terization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell line. Int. J. Cancer 25, 19 - 32.

Lebenslauf

Am 11. 1. 1948 wurde ich als erstes von vier Kindern des späteren Majors Hans-Werner Schieb und seiner Ehefrau Annelene, geb. Oeltjen, in Oldenburg/Oldb. geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit in Bad Zwischenahn besuchte ich die neusprachlichen Mädchengymnasien in Siegburg und Oldenburg, wo ich am 15. 9. 1966 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich mit dem Studium der Biochemie in Tübingen. Nach meiner Eheschließung mit dem damaligen cand. med. Johannes Löwer am 21. 9. 1968 wechselte ich das Studienziel. In den Fächern Biologie und Chemie legte ich am 23. 2. 1970 die Erste Prüfung , am 26. 2. 1971 die Zweite Prüfung für das Lehramt an Realschulen ab. Am 10. 6. 1971 wurde unsere Tochter Cornelia geboren.

Nach kurzer Tätigkeit am Oberschulamt Tübingen nahm ich ab Sommersemester 1972 meine Studien an der Universität Tübingen wieder auf und legte nach dem Sommersemester 1973 den mündlichen Teil der Diplomprüfung im Fach Biologie ab. Bedingt durch die Geburt unserer zweiten Tochter Bettina am 21. 12. 1973 verschob sich die Durchführung der Diplomarbeit mit dem Thema "Untersuchungen zur Genetik der weißen und gelben Blütenfarbe bei der Sommeraster Callistephus chinensis (L.) Nees" bei Herrn Professor Dr. W. Seyffert um etwa zwei Jahre. Am 21. 4. 1976 erhielt ich das Diplom im Fach Biologie. Am 16. 11. 1976 wurde unser Sohn Alexander geboren.

In der Zeit von September 1977 bis Ende des Jahres 1980 arbeitete ich an einer Dissertation mit dem Thema "Nachweis Retrovirus-ähnlicher Partikel in humanen Teratocarcinomzellinien" bei Herrn Professor Dr. R. Kurth am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen. Da Professor Kurth einem Ruf an das Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt, folgte und mein Mann dort ebenfalls eine Stelle annahm, verzögerten Umzug und familiäre Verpflichtungen die Fertigstellung der Dissertation. 1983 konnte ich die Ergebnisse am Paul-Ehrlich-Institut auswerten und niederschreiben.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, C.F. Bardele, E. Bayer, E. Bünning, H. Frank,
K.G. Grell, W. Harder, E. Kulzer, R. Kurth, K. Mägdefrau,
H. Metzner, G.F. Meyer, F.P. Möhres, K. Mörike, E. Müller,
W. Nultsch, W. Rähle, W. Rüdorff, H. Schenk, W. Schweizer,
B. Schwemmle, W. Seyffert, H. Stegmann, G. Weitzel,
K. Wöhrmann, H. Zähner, K. Zetsche.